anta M. Cucuianu
enga A. Hodârnău

METODE BIOCHIMICE ÎN LABORATORUL CLINIC

Dacia

Scanned with OKEN Scanner

I. MANTA
G. BENGA
M. CUCUIANU
A. HODÂRNĂU

METODE BIOCHIMICE ÎN LABORATORUL CLINIC

EDITURA DACIA
CLUJ-NAPOCA
1976

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

Biochimia clinică a progresat atît de mult în ultimele decenii încît a impus trecerea de la o medicină anatomoclinică spre o medicină bazată pe biologia moleculară. Datele furnizate de laboratorul de biochimie, interpretate în lumina datelor clinice, contribuie din ce în ce mai mult la formularea diagnosticului, la stabilirea prognosticului şi la controlul terapiei. Mai mult chiar, concepţia preventivă în medicină impune depistarea îmbolnăvirilor într-un stadiu cît mai precoce, într-o aşa-zisă fază biochimică. Nu este deci de mirare că numărul şi felul analizelor solicitate laboratorului de biochimie creşte de la an la an.

Răspunzînd acestor necesităţi de ordin obiectiv, eforturile oamenilor de laborator au dus la înmulţirea şi perfecţionarea tehnicilor de lucru. Autoanalizatoarele utilizează electronica pentru calcul şi memorizare, microanaliza permite efectuarea unui mare număr de analize în condiţii economice avantajoase iar utilizarea seturilor de reactivi face să se întrevadă o standardizare a metodelor de lucru şi a exprimării rezultatelor.

Pentru ca medicina noastră să beneficieze de pe urma acestor progrese este neapărată nevoie de formarea unor cadre de specialişti care să nu se limiteze la executarea mecanică a unor teste cu ajutorul seturilor, ci să înţeleagă mecanismul reacţiilor, să sesizeze posibilităţile de eroare şi să fie în măsură să interpreteze rezultatele. Principalul scop al acestei cărţi este acela de a contribui la formarea unor astfel de cadre în laboratoarele de biochimie din ţara noastră. Sîntem pe deplin conştienţi de dificultatea unei astfel de sarcini cu atît mai mult cu cît în laboratoarele de biochimie clinică lucrează personal cu pregătire diferită: chimişti, biologi, medici, unii avînd cunoştinţe mai temeinice în privinţa metodelor utilizate de chimie, iar alţii fiind mai familiarizaţi cu interpretarea rezultatelor. Din acest motiv în partea generală şi la anexe am introdus unele noţiuni elementare de chimie analitică. Principalul criteriu folosit în alegerea tehnicilor de lucru şi în extensia dată acestora, a fost acela al utilităţii în diagnostic. Am insistat asupra acelor metode aplicabile într-un laborator clinic cu dotare medie şi am dat doar indicaţii bibliografice cu pivire la unele tehnici speciale cum ar fi cele imunochimice sau cromatografice. De asemenea, analizele hormonale nu sînt incluse între metodele pe care le vom prezenta. Pe de

Scanned with OKEN Scanner

altă parte am considerat util să înfăţişăm cititorului posibilităţile variate de dozare a diverşilor componenţi din lichidele biologice. Am procedat în acest fel în primul rînd spre a dezvolta gîndirea omului de laborator care e pus să cîntărească avantajele şi neajunsurile diverselor metode. Pe de altă parte posibilităţile de aplicare a unei sau altei tehnici depind de dotarea laboratoarelor, şi din acest motiv ne-am ferit să dăm verdicte asupra metodelor.

Dorind să publicăm o carte viabilă, ne dăm însă seama că utilitatea ei va fi limitată în timp; ne vom considera mulţumiţi atunci cînd prezentul manual va fi depăşit de dezvoltarea cunoştinţelor de biochimie clinică, de dotarea din ce în ce mai bună a laboratoarelor noastre şi de standardizarea şi automatizarea metodelor de lucru.

AUTORII

Scanned with OKEN Scanner

Cuprins

PARTEA GENERALĂ

17 1. **Introducere**
18 2. **Sticlăria de laborator**
18 2.1. Vase pentru măsurarea volumelor
21 2.2. Vase speciale folosite în laboratorul clinic
21 2.3. Materiale necesare pentru microanaliză
27 2.4. Spălarea sticlăriei de laborator
28 2.5. Vase din plastic
29 2.6. Apa bidistilată și apa demineralizată
29 3. **Soluții**
29 3.1. Atom-gram, moleculă-gram, echivalent gram
31 3.2. Concentrația soluțiilor
33 3.3. Titru, factor, substanțe etalon sau titrimetrice
36 3.4. Dizolvanții
36 3.5. Tăria ionică
37 3.6. Prepararea unor soluții uzuale
44 3.7. Indicatorii
49 4. **Metode fizico-chimice de analiză în laboratorul clinic**
49 4.1. Metode spectroscopice (optice)
50 4.1.1. Bazele teoretice ale metodelor optice
55 4.1.2. Metodele colorimetrice
56 4.1.3. Metodele fotometrice
62 4.1.4. Fotometria de flacără
65 4.1.5. Spectroscopia de absorbție atomică
68 4.1.6. Fluorimetria
70 4.2. Metode cromatografice
70 4.2.1. Cromatografia pe hîrtie
72 4.2.2. Cromatografia în strat subțire
74 5. **Noțiuni generale de analiză enzimatică**
75 5.1. Factorii care influențează determinarea activității enzimelor
80 5.2. Unități enzimatice
82 5.3. Determinarea practică a activității enzimatice
82 5.3.1. Determinarea în două puncte
83 5.3.2. Metodele cinetice
87 5.4. Calculul activității enzimatice
87 5.4.1. Utilizarea simultană a unui standard
87 5.4.2. Utilizarea coeficientului molar de extincție
88 5.4.3. Metoda grafică
89 5.4.4. Exemple de calcul
90 5.4.5. Reacții neliniare
91 5.5. Surse de eroare
91 6. **Ultramicroanaliza în laboratorul clinic**
92 6.1. Determinări pe lichide biologice
93 6.1.1. Recoltarea sîngelui capilar
95 6.1.2. Tehnici generale ultramicroanalitice

Scanned with OKEN Scanner

101 6.2. Determinări de țesuturi umane
101 6.2.1. Recoltarea materialului
102 6.2.2. Principalele operații analitice
105 6.2.3. Raportarea activității enzimatice
107 6.2.4. Dificultăți în determinările pe țesuturi

METODE DE ANALIZĂ
ANALIZA SÎNGELUI
110 1. **Recoltarea sîngelui**
111 2. **Proteinele serice**
112 2.1. Dozarea proteinelor prin spectrofotometrie la 280 nm.
2.2. Dozarea proteinelor prin spectrofotometrie în prezența de acizi
113 nucleici (la 260 și 280 nm)
114 2.3. Dozarea proteinelor prin spectrofotometrie la 210 nm
115 2.4. Dozarea proteinelor totale prin metoda Lowry
2.5. Dozarea proteinelor totale prin metoda Gornall (reacția biure-
117 tului)
118 2.6. Dozarea albuminei serice cu bromcrezol purpur
119 2.7. Teste de disproteinemie
122 2.8. Electroforeza proteinelor serice
123 2.8.1. Electroforeza pe hîrtie de filtru
125 2.8.2. Electroforeza pe acetat de celuloză
126 2.8.3. Electroforeza în gel de amidon sau în gel de poliacri-
lamidă (indicații bibliografice)
127 2.9. Glicoproteinele
127 2.9.1. Determinarea fracțiunii seromucoidice
128 2.9.2. Determinarea hexozelor legate de proteine
128 2.9.3. Determinarea acidului sialic
2.9.4. Electroforeza glicoproteinelor serice (indicații biblio-
129 grafice)
129 2.9.5. Interpretarea modificărilor glicoproteinelor serice
130 2.10. Interpretarea modificărilor proteinelor plasmatice
132 2.11. Analiza imunochimică a proteinelor (indicații bibliografice)
133 3. **Dozarea substanțelor azotate serice**
133 3.1. Determinarea azotului total
136 3.2. Dozarea azotului neproteic
136 3.2.1. Deproteinizarea cu acid tricloracetic
137 3.2.2. Deproteinizarea cu acid wolframic și acid sulfuric
137 3.2.3. Dozarea azotului polipeptidic
138 3.2.4. Dozarea colorimetrică a azotului neproteic
140 3.3. Dozarea azotului ureic din ser
140 3.3.1. Metoda cu urează
143 3.3.2. Metoda Kowarsky
145 3.4. Dozarea acidului uric în ser
146 3.5. Dozarea azotului amino-acidic
146 3.6. Dozarea amoniacului în sînge
148 3.7. Dozarea creatininei și creatinei
148 3.7.1. Dozarea creatininei serice
149 3.7.2. Dozarea creatinei în ser (creatinina totală)
3.8. Substratele azotate neproteice și insuficiența renală (interpre-
150 tare)
151 4. **Hemoglobina și derivații**
151 4.1. Determinarea hematocritului

Scanned with OKEN Scanner

153 4.2. Dozarea fotometrică a hemoglobinei
153 4.2.1. Dozarea hemoglobinei ca cianmethemoglobină
154 4.2.2. Dozarea hemoglobinei ca oxihemoglobină
155 4.2.3. Determinarea hemoglobinei pe baza conţinutului în fier (Metoda Wong)
156 4.3. Conţinutul în hemoglobină al hematiilor
158 4.4. Dozarea methemoglobinei
159 4.5. Dozarea carboxihemoglobinei
160 4.6. Dozarea hemoglobinei fetale
163 4.7. Determinarea bilirubinei
164 4.7.1. Prepararea soluţiei standard de bilirubină
165 4.7.2. Determinarea bilirubinei plasmatice la nou-născuţi prin spectrofotometrie directă
166 4.7.3. Determinarea bilirubinei directe şi a celei totale prin reacţia de diazotare
167 4.7.3.1. Varianta cu metanol (Maloy şi Evelyn, modificată)
169 4.7.3.2. Metoda Jendrassik-Grof, modificată (cu cofeină, acetat şi benzoat de Na).
171 4.7.4. Interpretarea modificărilor bilirubinei serice
172 **5. Lipidele serice**
172 5.1. Determinarea lipidelor totale
172 5.1.1. Metoda gravimetrică Sperry
173 5.2.1. Metoda colorimetrică Zöllner şi Kirsch
175 5.3.1. Metoda colorimetrică simplificată
176 5.2. Determinarea colesterolului total
176 5.2.1. Metoda Watson
176 5.2.2. Metoda Ferro şi Ham (după Crocket şi colab.)
177 5.2.3. Metoda Zlatkis-Zak-Boyle
178 5.2.4. Determinarea colesterolului în prezenţa pigmenţilor biliari
179 5.3. Dozarea colesterolului liber şi esterificat
180 5.4. Dozarea trigliceridelor
180 5.4.1. Metoda colorimetrică. Reacţia cu acid cromotropic
183 5.4.2. Metoda enzimatică (Metoda Eggstein modificată)
185 5.5. Dozarea fosfolipidelor totale
286 5.6. Dozarea acizilor graşi liberi
186 5.6.1. Metoda titrimetrică Dole
187 5.6.2. Metoda colorimetrică Novák
188 5.7. Dozarea glicerolului seric (Metoda Lambert şi Neish modificată de Korn)
189 5.8. Determinarea corpilor cetonici
190 5.9. Determinarea lipoproteinelor
191 5.9.1. Precipitarea beta-lipoproteinelor (după Burnstein)
192 5.9.2. Dozarea colesterolului legat de beta-lipoproteine
193 5.9.3. Metoda Kunkel
194 5.9.4. Separarea electroforetică a lipoproteinelor
198 5.10. Interpretarea modificărilor lipidelor serice
204 5.11. Separarea lipidelor prin cromatografie în strat subţire (indicaţii bibliografice)
205 **6. Glucidele şi metabolitii lor**
205 6.1. Dozarea glucozei
205 6.1.1. Metoda enzimatică
207 6.1.2. Dozarea colorimetrică cu reactiv arsenomolibdenic

Scanned with OKEN Scanner

209 6.1.3. Metoda colorimetrică cu antronă
210 6.1.4. Metoda colorimetrică cu orto-toluidină
211 6.1.5. Dozarea titrimetrică (Hagedorn-Jensen)
214 6.1.6. Interpretarea modificărilor patologice ale glicemiei
214 6.2. Dozarea galactozei
216 6.3. Dozarea fructozei
218 6.4. Dozarea inulinei și fructozei
219 6.5. Determinarea pentozelor (D-Xiloza)
220 6.6. Dozarea hexozaminelor (Glucozamina)
222 6.7. Determinarea acidului lactic
222 6.7.1. Metoda enzimatică
224 6.7.2. Metoda colorimetrică
226 6.8. Determinarea acidului piruvic
226 6.8.1. Metoda enzimatică
228 6.8.2. Determinarea colorimetrică
230 **7. Substanțele minerale din plasmă**
230 7.1. Dozarea electroliților
231 7.1.1. Sodiul și potasiul
233 7.1.2. Calciul
234 7.1.2.1. Determinarea prin fotometrie de flacără
234 7.1.2.2. Metoda permanganometrică
236 7.1.2.3. Metoda complexometrică
236 7.1.2.4. Determinarea complexometrică ultramicroanalitică
238 7.1.2.5. Calciul ionizat
239 7.1.3. Dozarea magneziului
239 7.1.3.1. Metoda colorimetrică Man-Yoe modificată de Bohuon
241 7.1.3.2. Metoda cu galben-titan
243 7.1.4. Dozarea clorului
243 7.1.4.1. Procedeul titrimetric Schales și Schales
245 7.1.4.2. Determinarea clorului globular și plasmatic
245 7.1.4.3. Metoda spectrofotometrică ultramicroanalitică
246 7.1.4.4. Metoda fotometrică cu cloranilat de mercur
247 7.1.4.5. Metoda argentometrică (van Slyke)
248 7.1.5. Dozarea fosforului seric
249 7.1.5.1. Dozarea fosforului anorganic (fără precipitarea proteinelor)
250 7.1.5.2. Metoda Briggs
251 7.1.5.3. Metoda cu acid ascorbic (cu precipitarea proteinelor).
252 7.1.5.4. Dozarea fosforului total acidosolubil
253 7.1.5.5. Transformarea fosfatului anorganic din mg/100 ml în mEq/litru
254 7.2. Osmolaritatea plasmei
255 7.3. Interpretarea modificărilor patologice ale echilibrului hidro-mineral
257 7.4. Interpretarea modificărilor patologice ale calciului, fosforului și magneziului seric
257 7.5. Explorarea echilibrului acido-bazic
258 7.5.1. Metoda Astrup
263 7.5.2. Determinarea rapidă a rezervei alcaline (bicarbonat actual)

Scanned with OKEN Scanner

263 7.5.3. Interpretarea modificărilor patologice ale echilibrului acido-bazic
265 7.6. Determinarea volumului sanguin
266 7.6.1. Determinarea volumului plasmatic cu Albastru Evans (T 1824)
268 7.6.2. Determinarea volumului plasmatic cu albumină marcată cu I^{131} (RISA)
270 7.6.3. Determinarea volumului eritrocitar cu Cr^{51}
273 7.6.4. Interpretarea rezultatelor la determinările de volum sanguin
274 7.7. Fierul și cuprul seric
274 7.7.1. Fierul seric
275 7.7.1.1. Metoda Heilmeyer modificată
276 7.7.1.2. Metoda Sanford modificată de Lauber
278 7.7.2. Capacitatea de legare a fierului
279 7.7.2.1. Determinarea capacității totale de fixare a fierului (metoda Ramsay)
280 7.7.3. Cuprul seric
280 7.7.3.1. Metoda cu batocuproină
282 7.7.3.2. Metoda cu dietilditiocarbamat de sodiu
283 7.7.4. Determinarea ceruloplasminei
283 7.7.5. Interpretarea modificărilor patologice ale sideremiei și cupremiei
284 **8. Determinarea enzimelor plasmatice**
285 8.1. Determinarea activității amilazei
285 8.1.1. Metoda Smith și Roe (modificată)
287 8.1.2. Metoda ultramicroanalitică cu amiloză (Street-Close)
289 8.1.3. Metoda Wohlgemuth
290 8.2. Determinarea lipazei
290 8.2.1. Dozarea titrimetrică (Cherry-Crandall)
291 8.2.2. Dozarea colorimetrică (Kramer și colab.)
293 8.3. Determinarea colinesterazei serice
294 8.3.1. Metoda cinetică (Ellman și colab.)
296 8.3.2. Metoda colorimetrică (De la Huerga și colab.)
297 8.3.3. Metoda spectrofotometrică (Kallow și Lindsay)
299 8.4. Determinarea activității fosfatazelor
299 8.4.1. Determinarea fosfatazelor alcaline și acide cu metoda King-Armstrong
301 8.4.2. Determinarea fosfatazei alcaline prin metoda Bodansky
302 8.4.3. Determinarea fosfatazei alcaline cu paranitrofenilfosfat (Bassey-Lowry modificată)
304 8.4.4. Determinarea activității fosfatazei acide (metoda Bodansky modificată)
305 8.4.5. Determinarea activității fosfatazei acide cu paranitrofenilfosfat
306 8.4.6. Curba de calibrare pentru determinarea fosfatazelor cu paranitrofenilfosfat
307 8.4.7. Transformarea diverselor unități de activitate a fosfatazelor în unități internaționale (mU/ml)
308 8.5. Determinarea activității aldolazei
309 8.6. Determinarea activității transaminazelor
309 8.6.1. Metoda colorimetrică cu 2-4-dinitrofenil-hidrazină
311 8.6.2. Metoda spectrofotometrică în UV (test optic)

Scanned with OKEN Scanner

313 8.7. Dozarea activității ornitin-carbamiltransferazei (OCT)
313 8.7.1. Metode cu microdifuziune în celule Conway
316 8.7.2. Metoda simplificată de dozare a OCT
318 8.8. Determinarea activității creatin-fosfokinazei (CPK)
318 8.8.1. Determinarea activității CPK prin testul optic
322 8.9. Determinarea activității lactat-dehidrogenazei (LDH)
322 8.9.1. Determinarea activității globale a LDH (testul optic)
323 8.9.2. Determinarea activității izoenzimelor LDH
324 8.9.2.1. Diferențierea izoenzimelor LDH prin adsorbție pe DEAE-Sephadex
324 8.9.2.2. Separarea electroforetică a izoenzimelor LDH
326 8.9.2.3. Determinarea izoenzimelor LDH pe baza activității alfa-hidroxi-butirat-dehidrogenazei
327 8.10. Determinarea activității sorbitol-dehidrogenazei
328 8.11. Determinarea activității glutamat-dehidrogenazei
329 8.12. Determinarea 5-Nucleotidazei
330 8.13. Determinarea ceruloplasminei (metoda Ravin)
331 8.14. Determinarea activității lipolitice postheparinice
333 8.15. Determinarea activității lecitin-colesterol aciltransferazei (LCAT)
334 8.16. Interpretarea modificărilor enzimelor serice

339 **9. Explorarea hemostazei**
339 9.1. Factorii și mecanismul coagulării
342 9.2. Date generale de tehnică privind explorarea hemostazei
345 9.3. Timpul de sîngerare (Duke)
346 9.4. Timpul de sîngerare primară și secundară
346 9.5. Testul garoului
347 9.6. Numărul plăcuțelor sanguine
347 9.7. Timpul de coagulare (Lee și White)
347 9.8. Timpul de recalcificare (Howell)
348 9.9. Testul de toleranță la heparină
349 9.10. Timpul de protrombină (Quick)
350 9.11. Timpul de trombină
350 9.12. Testul de consumpție al protrombinei
352 9.13. Testul de generare a tromboplastinei
353 9.14. Determinarea fibrinogenului
353 9.14.1. Metoda rapidă Schultz
353 9.14.2. Metoda colorimetrică
355 9.15. Retracția cheagului
356 9.16. Timpul de liză al euglobulinelor
357 9.17. Timpul de liză al cheagului de sînge diluat
358 9.18. Determinarea rezistenței la streptokinază
359 9.19. Determinarea adezivității plachetare
360 9.20. Trombelastograma
365 9.21. Analize speciale mai rar solicitate
365 9.21.1. Determinarea factorului V
366 9.21.2. Determinarea factorului VII
367 9.21.3. Determinarea factorului VIII
369 9.21.4. Determinarea factorului IX
369 9.21.5. Determinarea factorului X
370 9.21.6. Test pentru depistarea unui deficit de factor XIII
371 9.21.7. Testarea semicantitativă a factorului XIII
374 9.21.8. Determinarea plasminogenului

Scanned with OKEN Scanner

9.21.9. Determinarea inhibitorilor serici ai activării plasminogenului 375
9.22. Interpretarea testelor de coagulare
Diagnosticul sindroamelor hemoragice 377

DETERMINĂRI PE ERITROCITE
1. Prepararea hemolizatului 380
2. Determinarea glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (metodă de screening) 381
3. Determinarea glucozo-6-fosfat dehidrogenazei prin testul optic 382
4. Methemoglobin-reductaza 383
5. Piruvat-kinaza 384
6. Glutation-reductaza 385

ANALIZA LICHIDULUI CEFALO-RAHIDIAN
1. **Determinarea proteinelor** 387
1.1. Probe calitative pentru evidenţierea globulinelor 387
1.1.1. Reacţia Pandy 387
1.1.2. Reacţia Nonne-Appelt 387
1.2. Determinarea semicantitativă a proteinelor 388
1.3. Dozarea cantitativă a proteinelor 388
2. **Dozarea glucozei** 389
3. **Dozarea clorurilor** 389
4. **Alte determinări** 390

ANALIZA URINEI
1. **Recoltarea urinei** 391
2. **Examene preliminare ale urinei** (cantitate, culoare, transparenţă, miros, densitate, pH) 391
3. **Analiza compuşilor patologici din urină** 395
3.1. Proteinele 395
3.1.1. Reacţii de identificare a proteinelor urinare 395
3.1.1.1. Proba prin încălzire în prezenţa acidului acetic 396
3.1.1.2. Proba cu acid sulfosalicilic 396
3.1.1.3. Proba cu acid tricloracetic 396
3.1.1.4. Proba Esbach 396
3.1.1.5. Proba cu acid azotic (Heller) 396
3.1.1.6. Proba Grimbert şi Dufau (evidenţierea mucoproteinelor) 397
3.1.1.7. Evidenţierea proteinelor Bence-Jones 397
3.1.2. Dozarea proteinelor urinare 398
3.1.2.1. Dozarea semicantitativă Esbach 398
3.1.2.2. Metoda cu acid sulfosalicilic 398
3.1.2.3. Metoda biuretului 399
3.2. Evidenţierea puroiului 400
3.3. Glucidele urinare 401
3.3.1. Evidenţierea glucidelor urinare 402
3.3.1.1. Reacţia Trommer 402
3.3.1.2. Reacţia Fehling 402
3.3.1.3. Reacţia Benedict 403
3.3.1.4. Reacţia Nylander 403
3.3.1.5. Diferenţierea glucozei de lactoza urinară (reacţia cu fenilhidrazină) 404
3.3.1.6. Identificarea fructozei urinare (reacţia Seliwanoff) 404

Scanned with OKEN Scanner

405 3.3.1.7. Identificarea pentozelor urinare
405 3.3.1.8. Identificarea galactozei
406 3.3.2. Dozarea glucozei urinare
406 3.3.2.1. Metoda Fehling
408 3.3.2.2. Metoda Sumner
409 3.3.3. Dozarea fructozei urinare
409 3.3.4. Dozarea galactozei urinare
410 3.3.5. Dozarea pentozelor urinare (D-Xiloza)
411 3.4. Corpi cetonici urinari
412 3.4.1. Identificarea acetonei
412 3.4.1.1. Reacţia Legal
412 3.4.1.2. Reacţia Lieben
412 3.4.2. Identificarea acidului acetil-acetic
413 3.4.3. Identificarea acidului beta-hidroxibutiric
413 3.5. Acizii biliari
414 3.5.1. Proba Hay
414 3.5.2. Reacţia Pettenkoffer
414 3.6. Pigmenţii biliari
414 3.6.1. Identificarea bilirubinei
415 3.6.1.1. Reacţia Trousseau
415 3.6.1.2. Reacţia Gmelin
415 3.6.1.3. Reacţia Fouchet
416 3.6.2. Urobilinoizii urinari
416 3.6.2.1. Urobilinogenul şi stercobilinogenul (Reacţia Ehrlich)
416 3.6.2.2. Urobilina şi stercobilina (reacţia Schlesinger-Jaffé)
417 3.7. Indicanul urinar
418 3.8. Sîngele, hemoglobina
418 3.8.1. Reacţia cu benzidină
418 3.8.2. Reacţia Thevenon-Rolland
419 3.8.3. Proba Perlés
419 3.9. Identificarea mioglobinei (Diferenţierea faţă de hemoglobină)
420 3.10. Porfirinele, porfobilinogenul, acidul delta-aminolevulinic
420 3.10.1. Probe calitative pentru evidenţierea porfirinelor
422 3.10.2. Dozarea spectrofotometrică a coproporfirinei şi a uroporfirinei urinare
424 3.10.3. Evidenţierea calitativă a porfobilinogenului
425 3.10.4. Dozarea spectrofotometrică a porfobilinogenului
425 3.10.5. Dozarea porfobilinogenului şi a acidului delta-aminolevulinic
428 3.10.6. Metoda simplificată de dozare a acidului delta-aminolevulinic
429 3.11. Identificarea melaninei
429 3.11.1. Teste de orientare
429 3.1.12. Testul Thormahlen
429 3.11.3. Testul Blackberg şi Wanger
430 3.12. Acidul fenilpiruvic
430 3.12.1. Reacţia cu clorură ferică
430 3.12.2. Dozarea acidului fenilpiruvic
432 3.13. Identificarea acidului homogentizinic
432 3.14. Identificarea şi dozarea acidului 5.hidroxi-indolacetic

Scanned with OKEN Scanner

433 3.14.1. Test calitativ de identificare
433 3.14.2. Determinarea cantitativă
434 3.15. Identificarea bromurilor
434 3.16. Teste rapide pentru evidenţierea compuşilor patologici urinari
435 4. **Dozarea principalelor substanţe minerale în urină**
435 4.1. Sodiul şi potasiul
436 4.2. Calciul
436 4.2.1. Proba Sulkovitch
436 4.2.2. Determinarea prin fotometrie de flacără
436 4.2.3. Metode permanganometrică
437 4.3. Magneziul
437 4.4. Fierul (indicaţii bibliografice)
438 4.5. Clorul
438 4.5.1. Metoda Schales
438 4.5.2. Metoda Mohr
439 4.6. Fosforul anorganic
439 4.7. Sulful urinar
439 4.7.1. Metoda Rosenheim-Drumond
440 5. **Dozarea principalelor substanţe organice din urină**
440 5.1. Dozarea azotului ureic
440 5.1.1. Metoda cu urează
441 5.1.2. Metoda Kowarsky
441 5.2. Dozarea acidului uric
442 5.3. Analiza aminoacizilor
442 5.3.1. Dozarea aminoacizilor totali
5.3.2. Separarea cromatografică a acizilor aminaţi (indicaţii
444 bibliografice)
445 5.4. Dozarea creatininei şi creatinei în urină
445 5.4.1. Dozarea creatininei urinare
446 5.4.2. Dozarea creatinei urinare
447 6. **Probe de clearance renal**
447 6.1. Clearance creatininic endogen
449 6.2. Clearance glomerular cu inulină
441 6.3. Clearance glomerular cu manitol
6.4. Clearance tubular. Coeficientul de depuraţie al acidului para
453 aminohipuric
457 6.5. Testul de excreţie al fenolsulfonftaleinei (roşu fenol)

459 EXAMENUL CALCULILOR URINARI
SUCUL GASTRIC ŞI DUODENAL
462 1. **Analiza sucului gastric**
462 1.1. Obţinerea sucului gastric şi stimularea secreţiei gastrice
463 1.2. Determinarea aciditătii sucului gastric
464 1.2.1. Determinarea pH-ului
464 1.2.2. Determinarea aciditătilor de titrare
467 1.3. Componenţi anormali ai sucului gastric
467 1.3.1. Evidenţierea acidului lactic (reacţia Uffelmann)
467 1.3.2. Evidenţierea sîngelui
467 1.3.3. Analiza enzimelor (indicaţii bibliografice)
468 2. **Sucul duodenal şi excreţia pancreasului exocrin**
468 2.1. Dozarea amilazei în sucul duodenal

ALTE LICHIDE BIOLOGICE
470 1. **Lichide de punctie. Exudate şi transudate**
472 2. **Dozarea clorului în secreţia sudorală**

Scanned with OKEN Scanner

ANALIZA MATERIILOR FECALE

476 1. **Reacţia**
477 2. **Depistarea hemoragiilor oculte**
477 2.1. Reacţia Gregersen
477 2.2. Reacţia Adler
478 3. **Determinarea calciului în fecale**
478 4. **Determinarea lipidelor în materiile fecale**
480 5. **Dozarea enzimelor în materiile fecale**
481 5.1. Determinarea enzimelor proteolitice în materiile fecale
482 6. **Analiza altor componente din fecale** (acizi organici, aminoacizi şi amoniac, pigmenţi biliari, mucus şi proteine exudative)

ANEXE

486 I. Unităţi de măsură
489 II. Tabel de conversiune din *mg%* în *mEq*/litru
490 III. Tabel de transformare a transmisiei în extincţie
493 IV. Proprietăţile maselor plastice utilizate în laborator
494 V. Prepararea soluţiilor cu concentraţia cunoscută
496 VI. Purificarea unor solvenţi organici
499 VII. Soluţii tampon

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA GENERALĂ

1. INTRODUCERE

Vom reaminti cîteva particularităţi matematice care uneori sînt uitate sau neglijate în laboratorul clinic. Astfel:

a) Toate indicaţiile numerice în chimia clinică sînt date cu trei cifre, cu suficientă precizie. Exemple:

22,3 *mg* azot ureic şi nu 22,32 sau 22,27
107 *mEq* de sodiu şi nu 107,2
436 *mg* colesterol şi nu 436,2 etc.

Aceasta pentru faptul că atunci cînd se fac calcule statistice prin rotunjirea la două cifre apar rezultate false.

b) De asemenea se va evita pe cît posibil, scrierea lui zero înaintea unei cifre. Vom alege deci în aşa fel unităţile de măsură în care exprimăm rezultatele încît să evităm acest lucru. Exemplu:

242 *mg* şi nu 0,242 *g* sau
25,0 *µl* şi nu 0,025 *ml*.

În acest fel erorile de calcul sînt mult mai mici.

c) În chimia clinică, cîmpul măsurătorilor se extinde pe mai multe zecimale (µg fier seric/100 *ml*, *mg* uree serică/100 *ml*, *g* albumină serică/100 *ml*); este necesar să se indice deci cifre mari sau mici. Aceasta este raţiunea pentru care se recomandă folosirea exponenţilor. Astfel:

în loc de 1000 se va scrie $1 \cdot 10^3$, iar
în loc de 1/1000 sau 0,001 se va scrie $1 \cdot 10^{-3}$

Printre progresele recent înregistrate în laboratorul clinic se numără automatizarea şi folosirea seturilor de reactivi gata preparate.

Executarea unui mare număr de operaţii identice în analizele din laboratorul clinic face posibilă automatizarea acestora.

În ultimii ani au fost realizate un număr mare de aparate numite *autoanalizoare*, care pot efectua pe o singură probă de ser cîteva zeci de determinări diferite. Aceste aparate se compun din următoarele elemente:

1. Schimbător automat de probe: serurile puse în eprubete într-un stativ special rotativ este aspirat mecanic la intervale regulate intrînd în circuit.

2. Pompă ce asigură aspirarea în proporţia necesară şi circulaţia în sistem a serului, a reactivilor şi a aerului.

Scanned with OKEN Scanner

3. Dispozitiv de amestecare (mixer) a serului cu reactivii de culoare.

4. Dializor: la trecerea prin aceste produşii coloraţi trec în alt sistem de tuburi în timp ce proteinele sînt reţinute. În acest fel este evitată precipitarea proteinelor şi centrifugarea din metodele obişnuite.

5. Baie de fierbere: în unele reacţii este necesară fierberea pentru obţinerea coloraţiei dorite.

6. Fotometru cu flux continuu: soluţia colorată trece prin cuva aparatului.

7. Înregistrator: extincţia soluţiei este înregistrată continuu, iar la unele aparate rezultatele sînt afişate direct în *mg*/100 *ml* ser sau *mEq*/100 *ml* ser.

Autoanalizoarele sînt foarte scumpe şi nu sînt justificate decît pentru laboratoarele care efectuează un număr foarte mare de analize zilnic. În laboratoarele mai mici se poate realiza o semiautomatizare prin utilizarea pipetelor automate de diferite tipuri, precum şi a sistemelor automate de golire a cuvelor fotometrice (vezi aparatul Spekol).

Folosirea seturilor de reactivi (teste) pentru determinări, reprezintă o cale pentru standardizarea determinărilor şi uşurează munca în laboratorul clinic. Soluţiile necesare pentru un anumit număr de determinări sînt livrate de către producători gata preparate sau se prepară foarte rapid prin adăugarea dizolvantului peste o cantitate de reactiv gata cîntărită. În acest fel analizele pot fi executate mai uşor de către personalul cu o calificare medie. Există seturi de reactivi pentru toate determinările din laboratorul clinic produse de către diferite firme. Preţul de cost al determinărilor devine mai mare prin utilizarea seturilor deoarece reactivii gata preparaţi sînt mai scumpi.

2. STICLĂRIA DE LABORATOR

2.1. Vase pentru măsurarea volumelor

Măsurarea volumelor şi cîntărirea sînt operaţiile cele mai importante din analiza volumetrică. Vasele de măsurat volume se pot împărţi în două clase mari:

a) Vase gradate pentru umplere al căror semn indică volumul pe care-l conţin. Ex.: baloane cotate, cilindri gradaţi.

b) Vase gradate pentru golire, al căror semn indică pînă unde se va umple vasul, pentru ca la golire să măsoare volumul indicat de gradaţia corespunzătoare. Ex.: unele baloane cotate, pipete, biurete.

Scanned with OKEN Scanner

Gradarea vaselor se face la 20°C, temperatură uşor de realizat şi care este considerată ca fiind temperatura normală internaţională pentru gradarea vaselor. În afară de temperatura de etalonare, pe fiecare vas se află gravată capacitatea sa şi simbolul G (golire) sau U (umplere):

500 *ml G* 20° sau 500 *ml U* 20°

Vasele gradate sînt confecţionate din sticlă cu rezistenţă chimică mare şi cît mai rezistentă la variaţiile de temperatură.

Dintre vasele gradate mai des utilizate amintim:

- *Baloane cotate*: sînt vase pentru umplere, au un fund plat şi un gît înalt subţire cu un semn circular care limitează volumul indicat. Unele baloane prezintă două semne circulare, cel inferior pentru umplere şi cel superior pentru golire. Baloanele cotate servesc pentru pregătirea soluţiilor titrate. Substanţa cîntărită se introduce în balon şi se adaugă puţină apă. După dizolvarea substanţei se aşteaptă cîtva timp pentru egalizarea temperaturii după care se completează cu apă la semn. Picăturile de apă rămase în gîtul balonului se şterg cu ajutorul unei hîrtii de filtru făcută sul, după care balonul, se închide cu dopul, apoi se răstoarnă de cîteva ori pentru omogenizarea conţinutului.

- *Cilindrii gradaţi*: sînt vase pentru umplere mai puţin precise decît baloanele servind numai pentru măsurători aproximative. Pot fi cu şi fără dop.

- *Pipetele*: sînt vase pentru golire şi sînt de două categorii: a) pipete fără gradaţii intermediare, cu ajutorul cărora se poate măsura volumul înscris pe pipetă, şi b) pipete cu gradaţii intermediare, cu ajutorul cărora, în limitele volumului înscris, se pot măsura şi fracţiuni de milimetru. Pentru măsurare se introduce în lichid vîrful pipetei aspirîndu-se pînă în momentul în care lichidul depăşeşte puţin gradaţia. Se astupă repede cu degetul arătător, se scoate pipeta din lichid, se şterge vîrful cu o hîrtie de filtru, după care se lasă să se scurgă lichidul pînă la gradaţie, şi anume pînă cînd marginea inferioară a meniscului format de lichid este tangentă la semn. Se introduce apoi pipeta în vasul în care trebuie măsurat lichidul, în aşa fel încît vîrful să atingă peretele interior al vasului şi se lasă lichidul să se scurgă liber. După cîteva secunde se trage cu încetul vîrful de-a lungul vasului, fără a sufla lichidul care a rămas.

- *Biuretele*: sînt vase pentru golire, alcătuite dintr-un tub gradat, prevăzut la partea inferioară cu un dispozitiv cu ajutorul căruia putem închide tubul sau regla scurgerea lichidului din biuretă. Acest dispozitiv poate fi un robinet din sticlă cu dop, şlefuit sau un tub de cauciuc, prevăzut cu o clemă. În cazul biuretelor cu robinet dopul şlefuit se unge cu puţină unsoare de robinet pentru a permite manipu-

Scanned with OKEN Scanner

larea lui mai uşoară; se va evita un exces. Biuretele se fixează în timpul lucrului într-un stativ metalic cu ajutorul clemelor. Poziţia lor trebuie să fie perfect verticală pentru ca citirea să se facă corect. Ele se vor umple cu lichidul folosit la titrare pînă peste semn, apoi prin deschiderea robinetului se va scurge lichidul pînă cînd meniscul inferior va fi tangent la gradaţie (pentru lichidele incolore), iar pentru cele colorate pînă cînd meniscul superior va fi tangent la gradaţie, după care robinetul se închide. În timpul folosirii se lasă lichidul să se scurgă liber cu o scurgere constantă pînă la volumul dorit după care robinetul se închide. Se va evita o scurgere prea rapidă deoarece aderenţa soluţiei la pereţi ar duce în acest caz la erori mari. De obicei, un debit corespunzător este de cca 10 *ml*/minut. Citirea gradaţiei de pe biuretă trebuie făcută în aşa fel încît eroarea de paralaxă să poată fi înlăturată. În acest scop, ochiul observatorului trebuie să se găsească pe linia orizontală tangentă la menisc. Dacă ochiul se găseşte de-asupra acestei orizontale vom obţine o eroare în minus, în caz contrar vom obţine o eroare în plus.

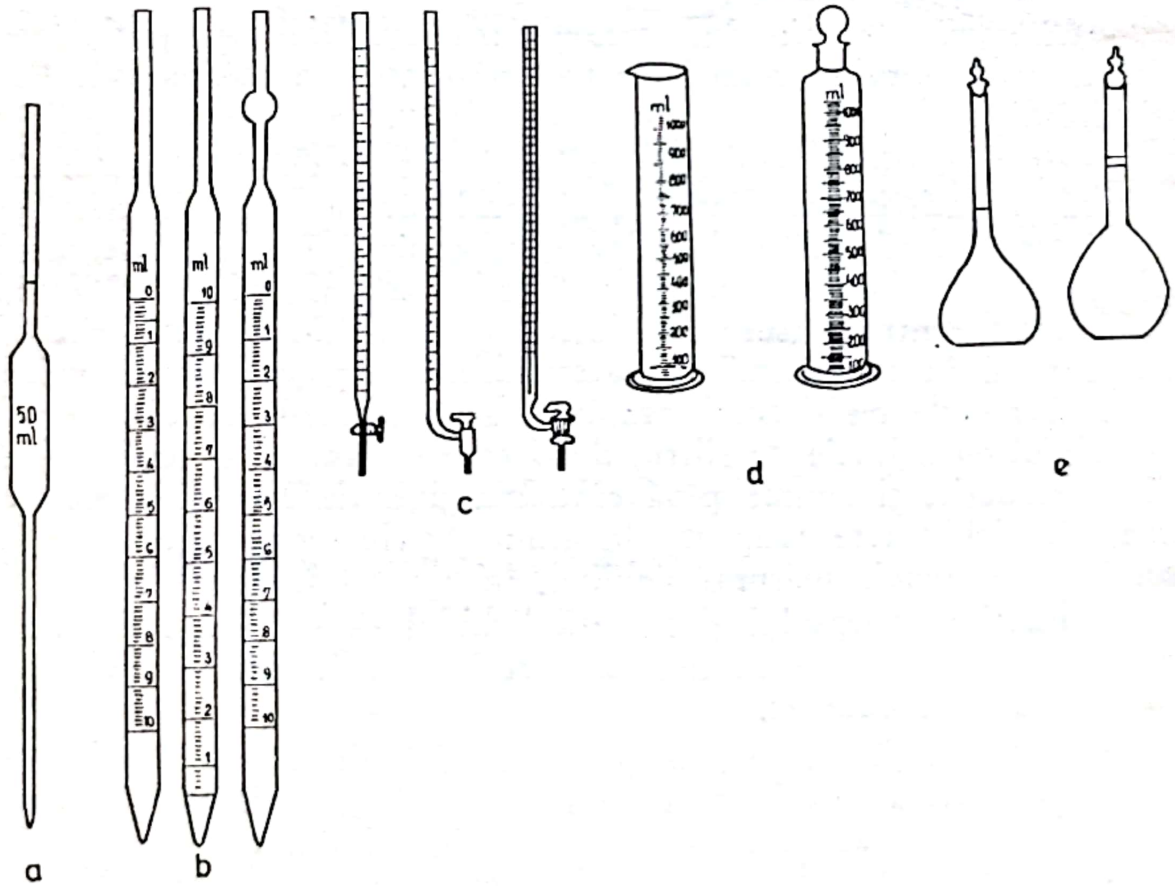


Fig. 1. Vase pentru măsurat volume: a) pipetă fără gradaţii intermediare; b) pipete cu gradaţii intermediare; c) biurete; d) cilindrii gradaţi; e) baloane cotate.

Scanned with OKEN Scanner

2.2. Vase speciale folosite în laboratorul clinic

2.2.1. ALBUMINOMETRU ESBACH

Serveşte la dozarea proteinelor din urină, prin metoda Esbach. Este alcătuit dintr-o eprubetă gradată cu pereţi mai groşi, care, în afară de gradaţie, mai prezintă două semne. Pînă la primul semn *U* se introduce urină filtrată, iar pînă la al doilea semn *R* se adaugă reactiv Esbach. Se citeşte pe gradaţie înălţimea stratului de precipitat obţinut după 24 ore.

2.2.2. RAHIALBUMINOMETRU SICARD—CANTALOUBE

Serveşte la determinarea proteinelor din L.C.R. Este asemănător albuminometrului Esbach. Are 5 gradaţii, fiecare gradaţie corespunzînd la 1 *ml*. Cantitatea corespunzătoare de proteine este următoarea:

pînă la diviziunea 1 = 0,22 g proteine ‰
" " " 2 = 0,40 g "
" " " 3 = 0,56 g "
" " " 4 = 0,71 g "
" " " 5 = 0,85 g "

2.2.3. CELULA CONWAY

Serveşte la determinarea amoniacului din urină şi din sînge. Este alcătuită din 2 capsule de sticlă concentrice, cu fund plat, cea exterioară cu ϕ de 5—6 *cm* fiind prevăzută cu capac. Cea interioară are un ϕ de 4 *cm*. În ea se introduce H_2SO_4 0,01 *n* cu titru cunoscut. În exterior, urina (sîngele) şi $K_2CO_3 \cdot H_2SO_4$ serveşte la captarea amoniacului care se degajă din urină în mediul puternic alcalin creat. (fig. 2.).

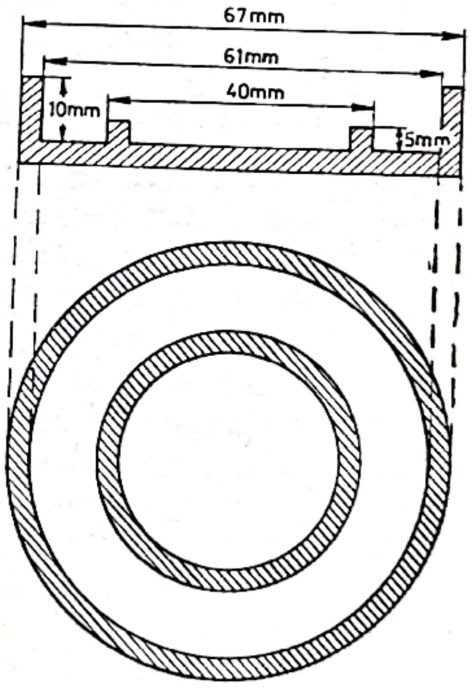


Fig. 2. Celula Conway pentru microdifuziune

2.3. Materiale necesare pentru microanaliză

În afară de materialele necesare pentru recoltarea sîngelui şi de cele utilizate

Scanned with OKEN Scanner

în diferitele tehnici (microcuvele în colorimetrie, microbiuretele în microtitrare) care sînt descrise la capitolul de ultramicroanaliză, la orice microanaliză se folosesc micropipete,, iar în multe determinări se lucrează în microeprubete.

- Micropipetele se folosesc pentru prelevarea unor volume sub 100 µl. În practică există peste 100 tipuri. Este important să se distingă două categorii mari: cele calibrate pentru umplere sau conținut (t.c. = to contain, sau wash-out) și cele pentru golire (t.d. = to deliver, sau blow-out).

La tipul de umplere (t.c.) pipeta trebuie spălată după golire cu lichidul de diluție de 2—3 ori, pe cînd la tipul de golire (t.d.) soluția din pipetă este doar eliminată în eprubetă. Pentru măsurători foarte precise, pipetele t.c. sau wash-out dau rezultate mai exacte; în schimb, dacă reproductibilitatea este mai importantă decît cantitatea absolută, deci totdeauna cînd se folosesc aceleași pipete pentru probă și standard, tipul de golire (t.d. sau blow-out) este mai ușor de manipulat.

Din categoria „wash-out" fac parte (fig. 3)

- Pipete *Folin* sau *Sahli* care constau dintr-un simplu tub capilar cu o marcă superioară. Aici aparține pipeta de 20 µl folosită în hemoglobinometrie. Deși pentru a trage soluția exact pînă la marcă este necesară o mare concentrare și se pierde destul de mult timp, totuși în lipsa altor micropipete se poate folosi această micropipetă.
- Pipeta cu constricție *Natelson*, de aceeași formă cu precedenta, prezintă însă pe parcursul tubului capilar una sau două zone mai strîmte.
- Pipeta cu constricție *Lang—Levy* în care prin aspirare lentă volumul se stabilește automat pînă la marcă. Măsurarea se face deci simplu și fără efort și este foarte precisă.
- Pipeta de transfer descrisă de *Kirk* și *Craig*, modificată de *Sisco*, *Cuningham* și *Kirk*, care constă dintr-un tub capilar conținînd două bule, una cu volumul de măsurat, cealaltă cu treaptă de siguranță. Pipeta este umplută cu ajutorul unei seringi de control din sticlă sau metal, care se poate adapta etanș la capătul pipetei.

Dintre pipetele "blow-out" amintim:

- Pipetele cu autoumplere ("self-filling pipets") descrise de *Kirk* și *Benedetti-Pichler*, cu volum sub 5 µl, pînă la 0,25 µl. Cînd vîrful este imersat în lichid, acesta urcă pînă la capătul tubului mic prin capilaritate și se oprește automat.
- Pipetele cu autoajustare conțin o bulă pe tractul tubului capilar. Lichidul este aspirat pînă umple bula și apoi se lasă imediat liber capătul pipetei astfel că lichidul urcă prin capilaritate pînă la marcă.
- Pipeta *Linderström-Lang*, la care umplerea se face prin forțarea lichidului din rezervorul exterior care înconjoară vîrful pipetei, după

Scanned with OKEN Scanner

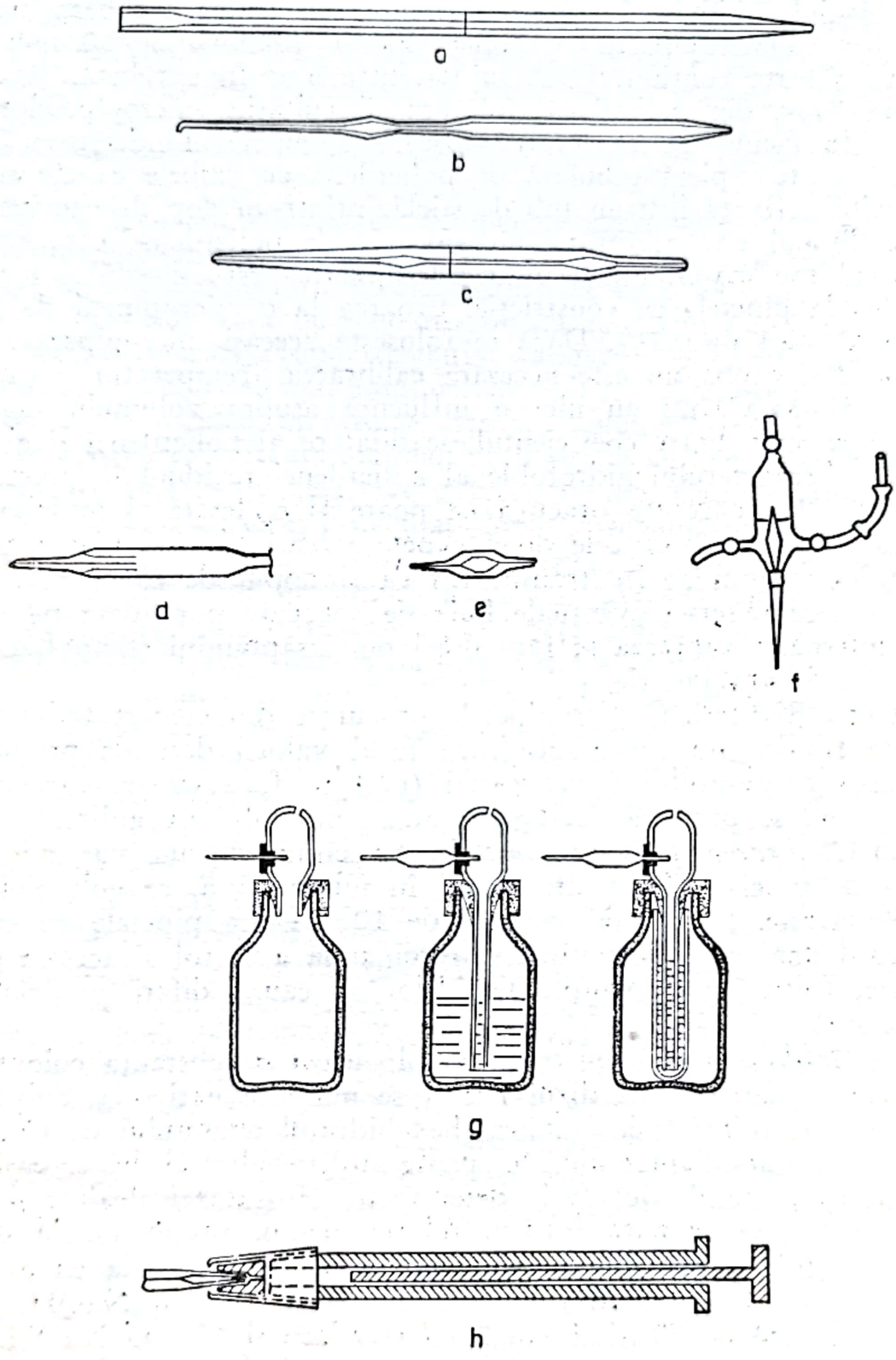


Fig. 3. Diferite tipuri de micropipete: a) Folin; b) Lang-Levy; c) Kirk; d) self-filling; e) self-adjusting; f) Lindenström-Lang; g) pipete Sanz; h) seringa de transfer Kirk.

Scanned with OKEN Scanner

care nivelul lichidului în rezervor este scăzut pentru a elibera capătul superior al micropipetei. Se aplică apoi o presiune de 50 *mm* apă pentru a forța conținutul tubului să intre ușor în eprubetă.
Pipeta *Sanz*, din polietilenă, înlătură dificultățile micropipetelor din sticlă. În esență ea este o modificare a pipetei Linderström-Lang. Constă dintr-o piesă tubulară de polietilenă cu ambele capete subțiri și flexibile, fixată într-un tub de sticlă, printr-un dop de cauciuc siliconic. Bulbul este așezat pe un vas mic de polietilenă, care conține reactivul sau materialul recoltat. Manipularea este simplă și mai rapidă ca la pipetele cu constricție. Eroarea la o micropipetă de 20 μl este mai mică de 0,3%. Dacă se folosește aceeași micropipetă pentru standard și probă nu este necesară calibrarea. Temperaturile cuprinse între 15—35°C. nu au nici o influență asupra volumului datorită diferenței mici dintre coeficientul de dilatare al polietilenei și al apei. Datorită caracterului hidrofobic al polietilenei reziduul în pipetă este neglijabil. Cu oarecare practică ea poate fi realizată și în laborator. Trebuie avut grijă ca cele două capete subțiri să aibă diametrul potrivit, iar bulbul să fie transparent ca și dopul de cauciuc siliconic, pentru a se observa eventuale bule de aer care pot adera pe suprafața internă. Calibrarea se face după două săptămîni (timpul de contracție) prin gravimetrie.

După Richterich, micropipetele procurate din comerț trebuiesc recalibrate fiindcă nu corespund întru totul valorii date de producător. Calibrarea conținutului micropipetei (t.c.) se face cu mercur, dar în laborator nu se practică decît calibrarea volumului de golire.

1) *Calibrarea prin gravimetrie.* Se cîntărește un vas mic la o balanță de precizie. Se aspiră lichid în micropipetă, se golește în vas și se cîntărește. Se repetă operația de 10 ori. La pipetele cu care se prelevează doar ser sau plasmă, se recomandă a se folosi acestea pentru calibrare, fiindcă proprietățile lichidelor în cauză diferă apreciabil de cele ale apei.

2) *Calibrarea colorimetrică.* Se pipetează o substanță colorată într-un volum oarecare de dizolvant și se măsoară extincția. Substanțele utilizate sînt: sulfatul de chimică, hexahidratul azotatului de Co, nicotinamida și paranitrofenolul. Se poate utiliza ultimul în aceeași concentrație ca și standardul de la determinarea fosfatazei alcaline și acide, de 0,002 M. Se prepară întîi o diluție macro, proporțională diluției micro de utilizat. De ex. pentru o pipetă de 10 μl, se ia cu o pipetă macro un *ml* de standard care se diluează cu 100 *ml* NaOH. 0,1 *n*. Pentru o pipetă de 20 μl se iau 2 *ml* standard și 100 *ml* NaOH. Apoi se măsoară extincția acestei soluții, E (macro). Se pune în continuare 1 *ml* NaOH 0,1 *n* în cuvă și se măsoară extincția față de apă. Se adaugă apoi 10 μl, respectiv 20 μl de soluție standard de paranitrofe-

Scanned with OKEN Scanner

nol, cu pipeta de calibrat, și se măsoară extincția. Se ia media de la cel puțin 5 determinări: E(micro). Volumul real se calculează înmulțind volumul indicat pe pipetă cu factorul următor:

$$\text{Factorul de calibrate} = \frac{E(\text{micro})}{E(\text{macro})}$$

Evident că este necesar ca și pipetele macro să fie cît mai exacte și colorimetrul de cît mai bună calitate. Rezultatele se interpretează statistic. Se calculează întîi media aritmetică care dă volumul real al pipetei și diferența față de valoarea dorită reprezintă eroarea absolută a pipetei. Se determină apoi deviația standard. Se poate calcula coeficientul de variație al mai multor micropipete. Eroarea absolută este importantă în metodele în care se măsoară volume absolute și este fără importanță dacă se măsoară standardul și proba cu aceeași micropipetă.

Spălarea micropipetelor cere o mare atenție. Cele de sticlă se vor clăti, de cîteva ori, cu apă imediat după întrebuințare, și apoi se va aspira în ele H_2SO_4 conc. în care se păstrează cîteva ore. Se spală apoi la trompă cu multă apă, pe urmă cu apă distilată și se usucă la trompă. Dacă este necesară o uscare rapidă se poate aspira acetonă sau alcool și apoi eter, dar în acest caz există posibilitatea contaminării cu grăsimi. Pipetele din polietilenă de tip Sanz se spală bine cu o soluție de pepsină-HCl. Se poate folosi și o soluție de detergenți.

Practic măsurarea volumelor cu micropipeta se face în felul următor: la micropipetă se atașează un tub de cauciuc, întocmai ca la recoltările pentru hemocitometrie, cu ajutorul căruia se aspiră lichidul pînă la semn sau puțin deasupra lui. După scoaterea din reactiv se șterge cu grijă exteriorul micropipetei și se aduce la semn cu hîrtie de filtru. Aplicînd o presiune ușoară se golește conținutul în eprubeta de reacție. În cazul pipetelor "wash-out" este necesar să se pună în prealabil în eprubetă un volum de reactiv în care se va introduce conținutul micropipetei, după care se spală de 2—3 ori pipeta fără a trece însă deasupra semnului. În cazul în care inițial s-a prelevat lichid peste semn, s-ar introduce prin spălare o eroare în plus. La pipetele "blow-out", conținutul se golește pe peretele eprubetei cît mai aproape de fundul acesteia, avînd grijă să nu se facă spumă apoi, fără a se spăla micropipeta, se adaugă ceilalți reactivi.

O'Brien și Ibbott fac următoarele recomandări pentru pipetele de tip Follin sau Kirk. După adaptarea unei seringi de tuberculină (sau a seringii de transfer Kirk) printr-un tub de cauciuc, pipeta se imersează vertical în lichid și se aspiră lichidul exact pînă la semn. Dacă se umezesc pereții peste semn aceasta introduce o eroare. Se scoate pipeta din lichid, se șterge cu hîrtie de filtru și se golește în eprubeta cu reactiv. Se spală de două ori prin aspirarea pînă la semn a reacti-

Scanned with OKEN Scanner

vului din eprubetă. Dacă s-a recoltat sîngele într-o microeprubetă cu ulei de parafină, după introducerea pipetei în lichid se aşteaptă cîteva secunde pînă uleiul se retrage din jurul vîrfului pipetei.

Insistăm asupra faptului că de atenţia cu care se pipetează, depinde în mare măsură eroarea finală în determinările microanalitice.

Microeprubetele (fig. 4) sînt indicate pentru analizele în care volumul final de reacţie este sub 1 *ml*, de ex. în determinările enzimatice pentru incubarea serului (10—20 *µl*) cu substratul (sub 100 *µl*). Microeprubetele pot avea diferite dimensiuni, în general în jur de 60 × 5 *mm*. Ele pot fi confecţionate din tuburi de sticlă în orice atelier de sticlărie. Dacă diametrul microeprubetei este sub 4 *mm*, lichidul din interior se scurge greu şi de aceea golirea în microcuvele colorimetrice trebuie să se facă printr-o răsturnare bruscă ţinînd în contact gura eprubetei cu peretele cuvei.

Microeprubetele se pun în microstative, de preferinţă din plastic (se pot introduce în baia de apă la incubare). Acestea se confecţionează uşor din cutii de plastic la care se fac orificii cu diametrul de 1 *cm* în capac, şi se lipesc lateral doi pereţi tot din cutii de plastic, cu puţin cloroform.

Agitarea microeprubetelor se poate face în diferite moduri: aducîndu-le în contact cu un excentric acţionat de un motor, sau cu un vibrator, prin agitare magnetică, introducînd în eprubete bile mici de

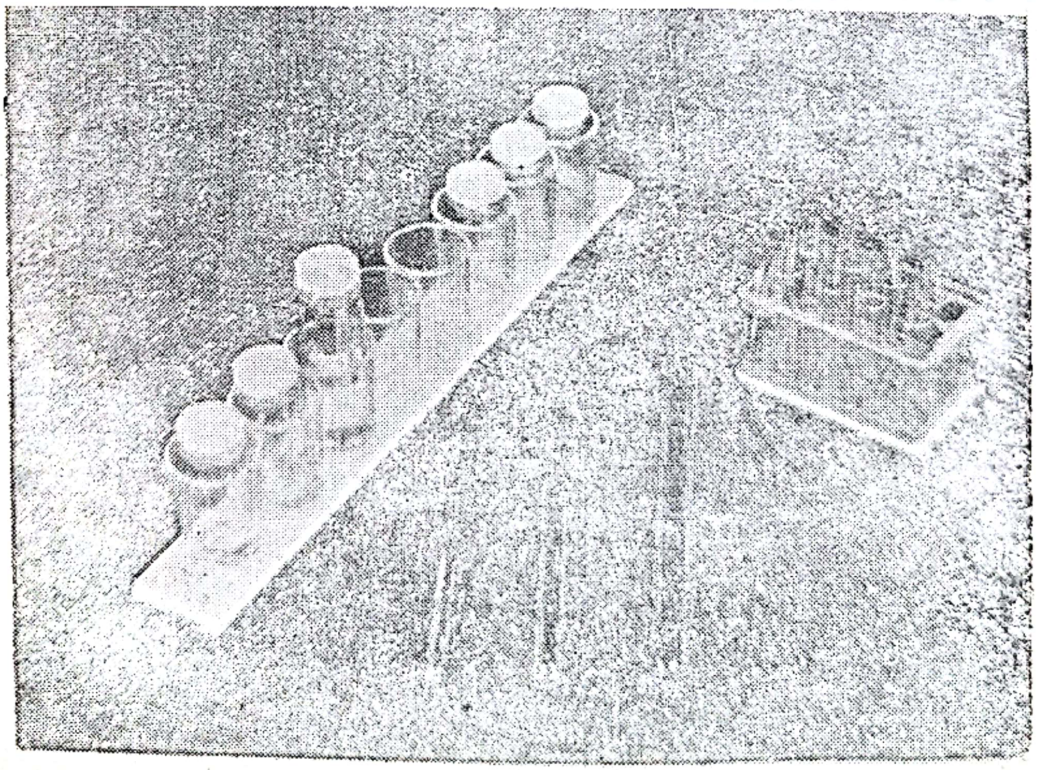


Fig. 4. Microeprubete şi microstative.

Scanned with OKEN Scanner

fier învelite în sticlă, sau se poate folosi un cui turtit fixat pe un burghiu ce se roteşte la 500—10.000 *r.p.m.* O eprubetă de 1 *ml* pe jumătate plină va fi amestecată fără ca lichidul să se verse.

În general, în ultramicroanaliză centrifugarea înlocuieşte filtrarea. Microeprubetele sînt mult mai rezistente decît eprubetele macro şi cele de hemoliză şi pot fi folosite pentru centrifugări prin simpla adaptare a unui inel de cauciuc. Prin utilizarea microeprubetelor se realizează astfel o economie importantă de sticlărie (eprubete obişnuite, tuburi de centrifugă) şi nu mai sînt necesare microcentrifugile. Prin confecţionarea unor reductoare speciale din material plastic (fig. 4) se pot efectua centrifugări la turaţii mari în ultracentrifugile cu refrigeraţie. Microeprubetele rezistă astfel pînă la 12.000 ture pe minut.

Dacă totuşi este necesară *filtrarea,* există tuburi de filtrare descrise de Emich şi Behrens-Hammers, care constau dintr-un tub capilar cu pereţi groşi, lărgit la capătul de filtrare unde se află un disc de sticlă poroasă acoperit cu un strat subţire de asbest fin.

Microseringile sînt necesare în special în determinările cinetice pentru injectarea sursei de enzimă sau a substratului în cuva colorimetrică, urmărind, în continuare, variaţia de extincţie. Există diferite modele, de la cele de tuberculină pînă la cele ultramicro de 10—20 μl, gradate în μl (fig. 3). Prin injectarea în cuvă se produce şi o amestecare a reactivilor.

2.4. | Spălarea sticlăriei de laborator

Sticlăria folosită în laborator trebuie să fie foarte curată. Se va acorda deci multă atenţie spălării sticlăriei. Spălarea se face în mai multe etape:

1. Spălarea preliminară

Imediat după întrebuinţare, pipetele se vor introduce într-un vas (ex. un cilindru de 500 ml) cu apă curată. Restul vaselor de laborator se vor clăti cu apă pentru a evita uscarea pe pereţi a substanţelor sau lichidelor biologice cu care s-a lucrat. Dacă sticlăria este contaminată cu substanţe grase, în loc de apă se foloseşte puţină acetonă comercială.

2. Spălarea cu acizi şi baze

a) Soluţiile de baze folosite curent pentru spălarea sticlăriei sînt: KOH 10% (10 g KOH + apă pînă la 100 *ml*) sau KOH alcoolic (100 g KOH dizolvat în 100 *ml* apă se răceşte şi se adaugă 900 *ml* alcool etilic comercial 70%).

b) Amestecul cromic este frecvent folosit pentru spălarea sticlăriei de laborator. El se obţine în felul următor: într-un vas cu capacitatea de 1 litru se introduce 500 *ml* apă distilată. Se adaugă cu grijă

250 *ml* acid sulfuric concentrat, prelingînd pe pereți și amestecînd continuu. Dacă soluția se încălzește foarte mult se răcește cu curent de apă. Cînd soluția este rece se adaugă 100 g bicromat de potasiu ($K_2Cr_2O_7$), se amestecă bine pînă la dizolvare și se adaugă apă pînă la 1 litru. Este bine ca la sfîrșit soluția să fie filtrată prin vată de sticlă pentru a nu se înfunda pipetele (soluția este foarte caustică și trebuie evitat să ajungă pe piele).

Pipetele care conțin urme de sînge se introduc în soluție de KOH 10%, timp de 24 ore.

Pipetele, biuretele, tuburile de centrifugă, eprubetele etc., se vor introduce în amestec cromic 12—24 ore.

În cazul contaminării vaselor cu rășini, acestea se vor spăla cu un amestec din două părți eter comercial și o parte benzen, lăsîndu-le 30 minute în acest amestec (lichidul este inflamabil).

3. Spălarea mecanică și cu detergenți

În interiorul vasului se introduce apă cu săpun sau detergent și apoi pereții vasului se freacă cu ajutorul unei perii.

4. Spălarea cu apă

După spălarea cu acizi, baze etc. vasele de laborator se clătesc cu multă apă, după care se clătesc de 4—5 ori cu apă distilată. Pipetele se vor spăla prin tragere la trompă în ordinea următoare: apă, apă distilată, alcool comercial, eter și aer. În acest fel se vor usca imediat. (După unii autori alcoolul și eterul conțin uneori urme de grăsimi).

Uscarea se face bine și în etuvă la 160°C, timp de 1—2 ore. În acest fel materialele se și sterilizează.

Dacă vasele nu sînt uscate, se vor clăti de 3—4 ori cu soluția cu care vor fi umplute.

2.5. | Vase din plastic

În ultima vreme în laboratoare se folosesc pe scară tot mai largă, diverse ustensile din material plastic. Folosirea lor este indicată în special în microanaliză. Pentru păstrarea soluțiilor care acționează asupra sticlei, se pot utiliza vase, capsule, baloane, flacoane etc., fabricate din polietilenă. Se folosesc de asemenea eprubete, pahare, capsule și baloane din politetrafluoretilenă (teflon), care pe lîngă marea rezistență față de acțiunea alcaliilor, acizilor (chiar și acidului florhidric), apei regale, prezintă și avantajul de a putea fi încălzite pînă la 300°C.

La anexe sînt date proprietățile diferitelor materiale plastice din care se confecționează vase de laborator.

Curățirea vaselor din material plastic se face folosind mijloace mecanice și detergenți.

Scanned with OKEN Scanner

2.6. | Apa bidistilată şi apa demineralizată

Se va prepara redistilînd apa distilată după ce i-am adăugat cîteva cristale de permanganat de K şi 2—3 picături de acid sulfuric. Prima fracţiune, cam 1/5 din volumul total, se va arunca. De asemeni ultima cincime. Pentru montarea aparatului vom întrebuinţa sticlărie de Jena. Aceeaşi sticlărie este recomandabilă pentru păstrarea apei bidistilate.

Demineralizarea apei se face şi prin trecerea apei de robinet printr-un filtru cu cationit (forma H), care reţine cationii şi apoi printr-un filtru cu anionit (forma OH) care reţine anionii.

Pentru a avea apă demineralizată permanent, se pot instala două coloane (în serie) de cationit şi respectiv anionit legate direct de robinetul din laborator. Debitul de apă trebuie reglat în aşa fel încît final din coloană să picure 10—15 picături de apă pe minut. Înălţimea coloanelor va fi de 1,5 *m*, cu un ϕ de 2,5—3 *cm*.

Schimbătorii de ioni utilizaţi în mod obişnuit la demineralizarea (deionizarea) apelor sînt cationiţii puternic acizi (ex. Zeo-Karb 225, forma HR) şi anioniţii puternic bazici (ex.: De-Acidite FF, forma ROH) de asemenea răşina mixtă Bio-Deminrolit, care conţine un amestec din răşinile amintite mai sus.

Regenerarea cationitului se face cu o soluţie 3—6% de HCl, iar a anionitului cu o soluţie de 3—4% de NaOH.

Alte tipuri de răşini utilizate în acest scop sînt: Amberlite MB_1, Amberlite MB_2 şi Amberlite MB_3.

3. | SOLUŢII

3.1. | Atom-gram, moleculă-gram, echivalent-gram

Atom-gramul reprezintă cantitatea în grame dintr-un element, egală numeric cu masa atomică a elementului. De exemplu:

Clor, masă atomică: 35,457, atom-gram: 35,457 g.

Molecula-gram (mol) reprezintă cantitatea în grame dintr-o substanţă egală cu valoarea numerică a masei moleculare a substanţei respective. De exemplu:

Molecula	*Masa moleculară*	*Molecula-gram*
Cl_2	70,914	70,914 *g*
H_2	2,016	2,016 *g*
H_2SO_4	98,075	98,075 *g*

Echivalentul-gram (val), reprezintă cantitatea dintr-un element, exprimată în grame, care se combină cu un atom gram de hidrogen

Scanned with OKEN Scanner

(1,008 *g*) sau cu jumătate dintr-un atom gram de oxigen (8 g), sau care poate înlocui aceste cantităţi de hidrogen sau oxigen din combinaţiile lor. În reacţiile de neutralizare (reacţii cu schimb de protoni) echivalentul gram se defineşte ca fiind cantitatea de substanţă care reacţionează cu un echivalent gram de protoni (= 1 ion-gram de hidrogen), în reacţia respectivă. În reacţiile de oxido-reducere prin echivalent-gram se înţelege cantitatea de substanţă care reacţionează cu un electron gram în reacţia respectivă. Pentru alte reacţii se defineşte echivalentul gram ca fiind cantitatea de substanţă care reacţionează cu cantitatea de substanţă ce corespunde unui proton-gram sau unui electron-gram.

Este foarte important ca în calculul echivalentului să ţinem seama neapărat de reacţia chimică ce are loc, în caz contrar calcularea greşită a echivalentului-gram poate duce la erori foarte mari ale rezultatului analizei.

Cantităţile de substanţă care reacţionează sau se înlocuiesc într-un proces chimic sînt echivalente între ele.

Echivalentul-gram la acizi se calculează împărţind molecula-gram la numărul atomilor de hidrogen ai acidului care participă la reacţia respectivă. Exemplu:

$$\text{echivalent-gram HCl} = \frac{36{,}465}{1} = 36{,}465\ g\ \text{HCl}$$

În reacţia: $H_3PO_4 + NaOH = NaH_2PO_4 + H_2O$ echivalentul-gram pentru H_3PO_4 este identic cu molecula-gram (97,998 g), deoarece numai unul din ionii de hidrogen ai acidului fosforic participă la reacţie.

În reacţia: $H_3PO_4 + 2NaOH = Na_2HPO_4 + H_2O$ participă doi ioni de hidrogen ai acidului fosforic, deci echivalentul-gram este $\frac{97{,}998}{2} = 48{,}999\ g$.

Echivalentul-gram la baze se calculează împărţind molecula-gram la numărul de oxidrili care iau parte la reacţia respectivă. Exemplu:

$$\text{echivalent-gram NaOH} = \frac{40{,}005}{1} = 40{,}005\ g$$

Echivalentul-gram la săruri se calculează împărţind molecula-gram la cifra care arată numărul de hidrogeni înlocuiţi de metal sau cifra obţinută prin înmulţirea valenţei maxime a ionului metalic prin numărul acestor ioni. Exemplu:

$$\text{echivalent-gram } FeSO_4 \cdot 7H_2O = \frac{273{,}01}{2} = 136{,}505\ g$$

$$\text{echivalent-gram } Fe_2(SO_4)_3 = \frac{399{,}9}{6} = 66{,}66\ g$$

Scanned with OKEN Scanner

Echivalent-gram în reacţiile de oxido-reducere reprezintă cantitatea de substanţă care reacţionează cu un electron-gram în reacţia respectivă. De exemplu, anionul MnO_4^- în care Mn este heptavalent reacţionează diferit în funcţie de mediul în care are loc reacţia.

Astfel, în mediu puternic acid (H_2SO_4), Nn^{7+} primeşte $5e^-$ trecînd în Mn^{2+} conform reacţiei:

$$MnO_4^- + 5e^- + 8H^+ \rightleftharpoons Mn^{2+} + 4H_2O$$

$$\text{echivalent-gram } KMnO_4 = \frac{158,03}{5} = 31,606\ g$$

În mediu slab acid sau neutru are loc reacţia:

$$MnO_4^- + 3e^- + 4H^+ \rightleftharpoons MnO_2 + 2H_2O$$

$$\text{echivalent-gram } KMnO_4 = \frac{158,03}{3} = 52,67\ g$$

În mediu puternic alcalin, permangantul reacţionează cn un singur electron conform reacţiei:

$$MnO_4^- + e^- \rightleftharpoons MnO_4^{2-}$$

$$\text{echivalent-gram } KMnO_4 = \frac{158,03}{1} = 158,03\ g$$

3.2. | Concentraţia soluţiilor

Raportul dintre substanţa dizolvată şi solvent reprezintă concentraţia soluţiei. Ea poate fi exprimată în mai multe moduri:

a) *Concentraţia procentuală de masă*, care reprezintă cantitatea în grame de substanţă dizolvată la 100 *g* de soluţie (%). De exemplu pentru a prepara o soluţie 10% de NaCl, se cîntăresc 10 *g* NaCl şi se adaugă 90 *g* apă.

b) *Concentraţia procentuală în volume*, care reprezintă volume de substanţă dizolvată (este vorba de substanţe lichide) la 100 *ml* de soluţie. Ea se foloseşte mai ales în cazul soluţiilor de alcool.

c) *Concentraţia molară sau molaritatea* reprezintă numărul de moli de substanţă dizolvată la 1000 *ml* de soluţie. Se notează cu *m* sau *M*. O soluţie molară conţine 1 *mol* în 1000 *ml* de soluţie. O soluţie milimolară conţine 1 *mmol*, iar o soluţie micromolară conţine 1 *µmol* substanţă la 1000 *ml* soluţie. Cînd se fac prescurtări trebuie să se evite confuzia dintre molar (*M*) şi *mol*. Astfel 1 *mol/ml* corespunde la o soluţie 1000 molară (1000 *M*), iar 1 *ml* dintr-o soluţie molară (1 *M*) conţine 1 *mmol* substanţă. În indicaţiile de *moli*, *mmoli* şi *µmoli*, *mol*-ul

Scanned with OKEN Scanner

trebuie scris totdeauna în întregime. La indicarea concentraţiilor molare am preferat prescurtarea *M* în loc de *m*, pentru a evita confuzia dintre *mM* (milimolar) şi *mm* (milimetru).

Pentru a prepara o soluţie molară (1 *M*) de HCl, se folosesc 36,5 *g* HCl la litru de soluţie, pentru o soluţie decimolară sau 0,1 *M* se foloseşte 3,65 *g* HCl la litru, în timp ce pentru una centimolară sau 0,01 *M* se folosesc 0,365 *g* HCl la litru etc.

Exemplu de calcul: HCl comercial are o concentraţie de 37% şi d = 1,12, să se prepare o soluţie 0,1 *M* de HCl. Se pleacă de la următorul raţionament:

$$\begin{array}{l} 100\ g\ \text{HCl comercial} \text{ ——— } 37\ \ g\ \text{HCl} \\ X \text{ ——————————— } 3{,}65\ g\ \text{HCl} \end{array}$$

$$X = \frac{100 \times 3{,}65}{37} = 9{,}86\ g\ \text{HCl comercial}$$

$$V = \frac{m}{d} = \frac{9{,}86}{1{,}12} = 8{,}8\ ml\ \text{HCl comercial}$$

Se măsoară 8,8 *ml* HCl comercial la 1000 *ml* soluţie.

Cunoscînd molaritatea (*M*) unei soluţii se poate afla cantitatea de substanţă dintr-un litru de soluţie folosind următoarea relaţie: *M*. greutatea moleculară = *g* substanţă/litru.

Invers cunoscînd cantitatea de substanţă la litru de soluţie, se poate calcula molaritatea după relaţia:

$$M = \frac{g\ \text{substanţă/litru}}{\text{greutate moleculară}}$$

d) Concentraţia normală sau *normalitatea* sau *concentraţia echivalentă* reprezintă numărul de echivalenţi-gram de substanţă dizolvată la 1000 *ml* soluţie. Se notează cu *n* sau *N*. O soluţie normală conţine un echivalent-gram (1 val) de substanţă dizolvată la 1 litru de soluţie. Pentru a prepara o soluţie normală de H_2SO_4 se utilizează 98/2 = 49 *g* H_2SO_4 la un litru de soluţie. Pentru una 0,1 *n* se utilizează 4,9 *g* H_2SO_4/litru de soluţie, iar pentru una 2 *n*, 98 *g* H_2SO_4 la litru de soluţie. Deci:

1 *val*/litru = o soluţie *n*
1 *mval*/litru = o soluţie 0,001 *n*
1 *μval*/litru = o soluţie 0,000001 *n*

Cunoscînd normalitatea unei soluţii (*n*) pentru a calcula cantitatea de substanţă dizolvată la litru de soluţie după relaţia:

$$\frac{\text{greutate moleculară}}{p} \cdot n = g\ \text{substanţă/litru}$$

Scanned with OKEN Scanner

unde p = valenţa (numărul de electroni, de ioni de hidrogen, de oxidrili sau echivalentul acestora cu care acţionează substanţa respectivă în reacţia folosită).

Invers cunoscînd cantitatea de substanţă la litru de soluţie, se poate calcula normalitatea după relaţia:

$$n = \frac{p \cdot g \text{ substanţă/litru}}{\text{greutate moleculară}}$$

Utilizarea soluţiilor normale în volumetrie prezintă următoarele avantaje:

1. Soluţii de aceeaşi normalitate reacţionează între ele în volume egale, deoarece conţin dizolvate substanţele în cantităţi echivalente. În consecinţă 20 *ml* HCl *n* neutralizează exact 20 *ml* NaOH *n*.
2. Un litru de soluţie exact normală de reactiv, reacţionează cu un echivalent-gram din altă substanţă, ceea ce simplifică mult calcularea rezultatelor.

e) Concentraţia molală sau *molalitatea* reprezintă numărul de moli de substanţă dizolvată la 1000 *g* de soluţie. În soluţii foarte diluate molaritatea este practic egală cu molalitatea. Dimpotrivă în soluţii concentrate există diferenţe mari.

3.3. | Titru, factor, substanţe etalon sau titrimetrice

Titrul unei soluţii reprezintă cantitatea de substanţă, exprimată în grame, care se găseşte dizolvată într-un *ml* de soluţie. Se notează cu T. Soluţia al cărui titru se cunoaşte se numeşte *soluţie titrată*. De exemplu: titrul unei soluţii exact normale de NaOH este 0,040005 *g* NaOH. Se raţionează în felul următor: dacă în 1000 *ml* soluţie se găsesc 40,0005 *g* NaOH, la 1 *ml* soluţie de NaOH se află T *g* NaOH. Deci:

$$T = \frac{40{,}0005}{1000} = 0{,}040005 \ g \ \text{NaOH}$$

Pentru obţinerea unei soluţii cu un anumit titru se procedează după următoarele două metode:

1. Fie prin cîntărirea unei anumite cantităţi din substanţa respectivă, dacă aceasta întruneşte condiţiile unei substanţe etalon (vezi mai departe substanţe etalon), dizolvînd-o în balon cotat şi diluînd cu apă la semn. Deoarece la majoritatea substanţelor dizolvarea este însoţită de degajare sau consum de căldură, după dizolvarea substanţei şi diluarea cu apă pînă aproape la semn (2—3 *ml* mai puţin), se aşteaptă

Scanned with OKEN Scanner

un timp oarecare pînă cînd soluţia din balon capătă temperatura mediului, după care se aduce definitiv la semn cu apă.

2. Fie prin titrare cu ajutorul unei substanţe etalon. Se cîntăreşte (la balanţa analitică, deci o cîntărire cu patru zecimale) o anumită cantitate din substanţa etalon şi anume 0,15—0,20 g, se dizolvă în apă şi se titrează cu soluţia al cărui titru dorim să-l determinăm. Nu se cîntăreşte mai puţin pentru ca eroarea de cîntărire să nu afecteze prea mult rezultatul titrării. De asemenea nu se cîntăreşte mai mult pentru ca să nu se folosească la titrare mai mult de 50 *ml* soluţie.

Dacă substanţa etalon are un echivalent prea mic şi cîntărirea unei cantităţi de 0,15—0,20 g ar necesita un consum prea mare de soluţie pentru titrare, atunci se procedează astfel: se cîntăreşte din substanţa etalon o cantitate necesară pentru 1 litru de soluţie de normalitatea dorită, de exemplu 0,1 *n*. De aici se ia o cotă parte şi se titrează cu soluţia al cărui titru urmează a se stabili. De exemplu: pentru stabilirea titrului unei soluţii de tiosulfat de sodiu cu $KBrO_3$, o cantitate de 0,20 *g* substanţă va consuma 71,80 *ml* soluţie 0,1 *n* de tiosulfat de sodiu; deci prea mult. De aceea se vor cîntări 2,7835 *g* $KBrO_3$ şi se diluează cu apă pînă la semn într-un balon cotat. Se obţine astfel o soluţie de 0,1 *n* de $KBrO_3$. Din aceasta se iau probe de 25 *ml* care se titrează cu o soluţie de tiosulfat.

Ca regulă generală, stabilirea titrului unei soluţii se face direct cu substanţa etalon şi nu cu ajutorul altei soluţii, căreia la rîndul ei i s-a stabilit titrul cu ajutorul unei substanţe etalon. Se va lucra cu o soluţie titrată, pe cît posibil, în aceleaşi condiţii în care s-a titrat această soluţie cu substanţa etalon (de exemplu se foloseşte acelaşi indicator). Pentru stabilirea titrului sînt necesare cel puţin două titrări, în scopul verificării concordanţei dintre rezultate. Cu cît numărul determinărilor este mai mare, cu atît titrul se va stabili mai precis.

Să considerăm titrarea substanţei *A* cu soluţia reactivului *B* (cu titrul T_B), după reacţia:

$$mA + nB = pC + 2D$$

Dacă s-au folosit la titrare Z *ml* reactiv *B*, cantitatea de substanţă *A* din proba analizată va fi:

$$X = \frac{Z \cdot T_B \cdot mGM_A}{nGM_B}$$

în care GM_A şi GM_B sînt greutăţile moleculare ale substanţelor *A* şi *B* participante la reacţia de titrare. (Se poate calcula şi titrul soluţiei *A*,

Scanned with OKEN Scanner

împărțind pe X la numărul de *ml* din soluția *A* care s-au luat la titrare).

Factor. În practică este mai ușor să se prepare soluții de normalitate exactă. Numărul care arată corespondența dintre 1 *ml* soluție aproximativ normală și o soluție exact normală se numește *factor* și se notează cu *F*.

De exemplu, pentru o soluție exact 0,1 *n* de NaOH titrul teoretic este de 0,0040. Pentru o soluție de NaOH aproximativ 0,1 *n*, să presupunem că titrul real este = 0,004328, factorul acestei soluții va fi:

$$F = \frac{T \text{ real}}{T \text{ teoretic}} = \frac{0{,}004328}{0{,}0040} = 1{,}0820$$

Aceasta înseamnă că la 1 *ml* din soluția noastră corespund 1,082 *ml* din soluția de NaOH exact 0,1 *n*.

În general, dacă se titrează o soluție a substanței *A* cu reactivul *B* (având normalitatea *n* și factorul *F*), folosind *V ml* din reactivul *B*, cantitatea de substanță *A* din proba analizată va fi:

$$g \text{ substanță } A = \frac{n \cdot F \cdot V \cdot GM_A}{1000}$$

unde GM_A este greutatea moleculară a substanței *A*.

Substanțele etalon sau *titrimetrice* sînt acele substanțe din care prin simplă cîntărire și dizolvare în balon cotat la volum cunoscut, se pot obține soluții cu concentrația cunoscută. În funcție de scopul la care servesc ele se împart în:

a) *Substanțele etalon primare sau standarde primare*, care servesc la obținerea directă a soluțiilor cu care prin titrare se vor executa diferite analize. Astfel sînt: $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ în permanganometrie, KIO_3 în iodatometrie, $K_2Cr_2O_7$ în bicromatometrie, NaCl și KCl în argentometrie, $AgNO_3$ pentru dozarea halogenurilor și pseudohalogenurilor etc.

b) *Substanțe etalon secundare* sau *standarde secundare*, care servesc pentru stabilirea titrului soluțiilor care se vor folosi ulterior pentru diferite determinări. De exemplu: $(COOH)_2 \cdot 2H_2O$. Acidul oxalic servește pentru stabilirea titrului soluției de NaOH.

O substanță titrimetrică trebuie să îndeplinească următoarele condiții: să fie foarte pură; să fie stabilă în condițiile de lucru (să nu se carbonateze, să nu se oxideze, să nu absoarbă apa sau să nu piardă apa de cristalizare); să fie stabilă în dizolvantul în care se utilizează; să se poată obține ușor în gradul de puritate necesar.

Scanned with OKEN Scanner

3.4. | Dizolvanţii

Dizolvanţii se împart în:

a) *Dizolvanţi indiferenţi,* care nu cauzează disocierea în ioni a substanţei care se dizolvă, indiferent dacă constanta lor dielectrică este mai mică sau mai mare. De exemplu: tetraclorura de carbon, sulfura de carbon, benzenul, cloroformul etc.

b) *Dizolvanţi neindiferenţi,* care cauzează disocierea în ioni a substanţei care se dizolvă. La rîndul său dizolvantul este şi el parţial disociat în ioni pozitivi şi negativi. Dizolvanţii neindiferenţi se împart, la rîndul lor, în două grupe:

— dizolvanţi neasemănători apei, care se disociază în ioni pozitivi şi negativi cu structură electronică completă. Exemple: NaCl în stare topită, NaOH, KOH, AgCl, $AlCl_3$, $ZnCl_2$ etc.;

— dizolvanţi asemănători apei, care se disociază în ioni pozitivi şi negativi, dar numai ionul negativ are structură electronică completă. Exemplu: H_2O, H_2SO_4 anh., $SbCl_3$ etc.

3.5. | Tăria ionică

Tăria ionică (j) este o mărime, definită ca fiind jumătate din suma termenilor obţinuţi prin înmulţirea concentraţiilor molare (C) ale fiecărui ion din soluţie, cu pătratul sarcinii sale electrice (Z). Deci:

$$j = \frac{1}{2} \sum C_i \cdot Z_i^2$$

Dacă vrem să calculăm tăria ionică a unei soluţii de NaCl 0,1 M, aceasta fiind disociată în Na^+ şi Cl^-, vom obţine:

$$j = \frac{1}{2} (0{,}1 \times 1^2 + 0{,}1 \times 1^2) = 0{,}1$$

În cazul unei soluţii 0,1 M de Na_2SO_4 pentru sodiu: $C = 0{,}1 \times 2 = 0{,}2\ M$, $Z = 1$ pentru ionul sulfat: $C = 0{,}1\ M$, $Z = 2$

deci final: $j = \frac{1}{2} (0{,}2 \times 1^2 + 0{,}1 \times 2^2) = \frac{1}{2} (0{,}2 + 0{,}4) = 0{,}3$

În cazul soluţiilor tampon, calculul este ceva mai complicat, fiind necesar să ţinem seama de cantităţile de soluţii care au fost utilizate la prepararea tamponului.

De exemplu, pentru prepararea unei soluţii de tampon fosfat 0,2 M se amestecă 20 *ml* soluţie 0,2 M de NaH_2PO_4 şi 80 *ml* soluţie

Scanned with OKEN Scanner

0,2 *M* de Na_2HPO_4. Se consideră că în soluția tampon NaH_2PO_4 se găsește disociat în ioni de Na^+ și $H_2PO_4^-$, iar Na_2HPO_4 în ioni de $2Na^+$ și HPO_4^{2-}. Din cei 100 *ml* amestec, NaH_2PO_4 reprezintă 1/5 în timp ce Na_2HPO_4 reprezintă 4/5.

Deci în cazul NaH_2PO_4:

pentru sodiu: $C = \frac{1}{5} \times 0{,}2$ și $Z = 1$

pentru $H_2PO_4^-$: $C = \frac{1}{5} \times 0{,}2$ și $Z = 1$

În cazul Na_2HPO_4:

pentru sodiu: $C = \frac{4}{5} \times 0{,}2 \times 2$ și $Z = 1$

pentru HPO_4^{2-}: $C = \frac{4}{5} \times 0{,}2$ și $Z = 2$

Deci final tăria ionică a amestecului tampon este:

$$j = \frac{1}{2}\left(\frac{1}{5} \times 0{,}2 \times 1^2 + \frac{1}{5} \times 0{,}2 \times 1^2 + 2 \times \frac{4}{5} \times 0{,}2 \times 1^2 + \right.$$

$$\left. + \frac{4}{5} \times 0{,}2 \times 2^2\right) = j = 0{,}57$$

Tăria ionică se mai numește și *putere ionică* sau *forță ionică*.

BIBLIOGRAFIE

Liteanu, C., *Chimie analitică* București, Ed. didactică și pedagogică, 1969. King, E. J., Wotton, I. D. P., *Micro-analysis in medical biochemistry*, Churchill, London, 1956.

3.6. | Prepararea unor soluții uzuale

Prepararea și stabilirea titrului unei soluții 0,1 n de acid clorhidric (HCl).

Se prepară mai întîi o soluție de normalitate aproximativă, urmînd ca apoi să se stabilească titrul cu ajutorul unor substanțe etalon. Acidul clorhidric din comerț are o concentrație de 37% și o densitate d = 1,19, deci 1 *ml* conține 0,44 g HCl. Deoarece pentru prepararea unei soluții 0,1 *n* de HCl sînt necesare 3,6461 g HCl la litru de soluție, se vor măsura 8,3 *ml* HCl concentrat ($C = 37\%$; $d = 1{,}19$) și se vor completa cu apă distilată pînă la 1 litru într-un balon cotat.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru stabilirea titrului vom folosi ca substanţă etalon carbonatul de sodiu, oxalatul de sodiu, iodatul de potasiu, boraxul. Din motive tehnice vom prefera iodatul de potasiu şi carbonatul de sodiu.

Iodatul de potasiu (KIO_3), greutatea echivalentă 35,667. În soluţie de HCl, iodatul de potasiu oxidează iodul din iodură conform reacţiei:

$$KIO_3 + 5KI + 6HCl = 3I_2 + 6KCl + 3H_2O$$

În continuare iodul este redus în prezenţa tiosulfatului conform reacţiei: $I_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaI + Na_2S_4O_6$

Practic se procedează în felul următor: se cîntăresc 0,15—0,20 *g* KIO_3, se solvă în 30—40 ml apă distilată, se adaugă 0,25—0,30 *g* KI şi 1,2—1,6 *g* $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$. Se titrează apoi în prezenţa roşului de metil pînă la trecerea persistentă a culorii de la galben către roşu (3 min.). Iodura de potasiu şi tiosulfatul de sodiu nu se cîntăresc la balanţa analitică. Soluţiile lor trebuie să aibă o reacţie neutră faţă de roşu de metil (galben). Titrul soluţiei de HCl se calculează din relaţia:

$$T = \frac{a \cdot 36{,}461}{n \cdot 35{,}667}$$

unde: $a = g$ KIO_3 cîntărit
$n = ml$ soluţie de HCl folosită la titrare.

Carbonatul de sodiu (Na_2CO_3), greutatea echivalentă 52, 994. Se cîntăresc 0,15—0,20 *g* substanţă într-un tubuşor de cîntărire. Se trece cantitativ cu apă într-un balon Erlenmeyer. Se adaugă 30—40 *ml* apă distilată. După dizolvare se titrează cu acid clorhidric la rece în prezenţa metiloranjului pînă la portocaliu. Se fierbe 2 minute pentru îndepărtarea CO_2, se răceşte şi se continuă titrarea pînă la trecerea culorii de la galben la portocaliu. Reacţia care are loc este următoarea:

$$Na_2CO_3 + 2HCl = 2NaCl + CO_2 + H_2O$$

Pentru obţinerea Na_2CO_3 folosiţi ca substanţă etalon se pleacă de la bicarbonat de sodiu pur, care se încălzeşte în cuptor electric la 270° — 300°C timp de 1 oră, amestecînd din cînd în cînd. Se răceşte în exicator, se cîntăreşte. Se repetă încălzirea pînă la pondere constantă. Titrul soluţiei de HCl se calculează din relaţia:

$$T = \frac{a \cdot 36{,}461}{n \cdot 52{,}994}$$

unde $a = g$ Na_2CO_3 cîntărit
$n = ml$ soluţie de HCl folosită la titrare

Scanned with OKEN Scanner

Pentru obținerea unei soluții 0,1 *n* de H_2SO_4 și stabilirea titrului se procedează în același mod, folosind însă o cantitate echivalentă de H_2SO_4.

Prepararea și stabilirea titrului unei soluții 0,1 n de hidroxid de sodiu (NaOH).

Soluția de hidroxid de sodiu folosită la titrarea acizilor trebuie să fie liberă de carbonat deoarece acidul carbonic care rezultă în cursul titrării, poate influența schimbarea culorii indicatorilor cu intervalul de viraj în mediu alcalin.

O soluție de NaOH liberă de carbonat se prepară, cîntărind 5—6 g de NaOH care se spală repede de 3—4 ori cu apă distilată pentru a îndepărta stratul de carbonat de la suprafață, după care se introduce într-o sticlă brună, se adaugă 1000 ml apă distilată liberă de CO_2 (CO_2 se îndepărtează din apă prin fierbere) și se acoperă cu un dop de cauciuc prevăzut cu un tub de calce sodată, care reține CO_2 din atmosferă. Se omogenizează soluția prin agitare și se stabilește titrul cu ajutorul unei substanțe etalon.

O substanță folosită frecvent ca etalon pentru stabilirea titrului unei soluții de NaOH, este *acidul oxalic* ($H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$); greutatea echivalentă 63,033.

Acidul oxalic se neutralizează cu NaOH pînă la oxalat neutru după reacția:

$$H_2C_2O_4 + 2NaOH = Na_2C_2O_4 + 2H_2O$$

Deoarece pentru acidul oxalic, la 22°C, pH-ul la punctul de echivalență este 8,61, se va folosi un indicator din domeniu alcalin, fenolftaleina (la punctul de echivalență roz).

Se cîntăresc 0,20—0,25 g acid oxalic, se dizolvă în 40—50 *ml* apă distilată fiartă în prealabil. Folosim în acest scop un balon Erlenmeyer. Soluția obținută se titrează la rece în prezență de fenolftaleină pînă la roz slab cu soluția de NaOH liberă de carbonat.

Dacă soluția de NaOH este carbonatată, are loc reacția: $H_2C_2O_4 + 2Na_2CO_3 = Na_2C_2O_4 + 2NaHCO_3$ de aceea în acest caz titrarea se va efectua la 80° — 90°C, cînd bicarbonatul de sodiu se descompune conform reacției:

$$2NaHCO_3 = Na_2CO_3 + CO_2 + H_2O$$

$$T = \frac{a \cdot 39{,}997}{n \cdot 63{,}033}$$

unde a = g acid oxalic cîntărit; n = *ml* soluție NaOH folosită la titrare.

Scanned with OKEN Scanner

Prepararea și stabilirea titrului unei soluții 0,1 n de azotat de argint ($AgNO_3$)

Azotatul de argint comercial conține o serie de impurități (argint metalic, Cu^{2+}, substanțe organice). Mai conține și apă (0,1—0,2%), de aceea trebuie purificat.

Pentru îndepărtarea impurităților substanța se recristalizează de 2—4 ori din apă acidulată cu acid azotic. Final se evaporă la uscare pe baia de apă. Pentru îndepărtarea apei este necesar să topim substanța (la 208°C) deoarece numai în acest fel apa este îndepărtată în întregime. Topirea trebuie efectuată la adăpost de praf și temperatura nu trebuie să depășească 250°C. După răcire se cîntărește o anumită cantitate (*a*) și cu apă se aduce cantitativ într-un balon cotat. Se completează cu apă distilată la semn. Titrul soluției se calculează din relația:

$$T = \frac{a}{V}$$

unde: $a = g$ substanță cîntărită

$V =$ volumul în *ml* la care se aduce soluția

O soluție de $AgNO_3$ aproximativ 0,1 *n* se mai poate prepara în felul următor: Se cîntăresc 17—18 *g* $AgNO_3$ comercial și se aduce cantitativ cu apă într-un balon cotat. Se completează cu apă distilată la 1 litru. Se stabilește apoi titrul prin titrare cu NaCl sau KCl.

Clorura de sodiu (NaCl), greutate echivalentă 58,443 și *clorura de potasiu* (KCl), greutate echivalentă 74,555, nu pot fi folosite direct pentru stabilirea titrului soluției de azotat de argint, deoarece conțin apă. Pentru îndepărtarea acesteia, NaCl sau KCl chimic pure se încălzesc într-o capsulă sau un creuzet la 500°—600°C pînă la greutate constantă. Din substanța astfel preparată se cîntărește o anumită cantitate în *g* (*a*) și se aduce la semn într-un balon cotat. Dacă notăm cu $V =$ volumul în *ml*, la care s-a adus soluția, atunci titrul soluției rezultă din relația:

$$T = \frac{a}{V}$$

Din soluția de NaCl sau KCl astfel obținută, se ia un anumit volum (de ex. 10—20 *ml*) și se titrează cu soluția de $AgNO_3$ aproximativ 0,1 *n* în prezență de K_2CrO_4, ca indicator (metoda Mohr). Și anume la soluția de clorură se adaugă 1 *ml* de soluție de cromat de potasiu (K_2CrO_4) 10% și se titrează cu soluția de $AgNO_3$ pînă la apariția unui precipitat cărămiziu de cromat de argint ($AgCrO_4$). Se

Scanned with OKEN Scanner

lucrează la un pH 6—10 deoarece în mediu acid precipitatul de Ag_2CrO_4 (cărămiziu) format se solvă, iar la un pH prea alcalin precipită Ag_2O. Reacţia care are loc este următoarea:

$$KCl + AgNO_3 = AgCl + KCl$$

Excesul de azotat de argint reacţionează cu indicatorul conform reacţiei:

$$2AgNO_3 + K_2CrO_4 = Ag_2CrO_4 + 2KNO_3$$

Titrul soluţiei de azotat de argint aproximativ 0,1 *n* se calculează din relaţia:

$$T = \frac{169{,}873 \cdot n \cdot T_{KCL}}{79{,}555 \cdot V}$$

unde: n = *ml* soluţie de KCl sau NaCl luată în lucru
T_{KCl} = titrul soluţiei de KCl
V = *ml* soluţie de $AgNO_3$ folosiţi la titrare.

Prepararea şi stabilirea titrului unei soluţii 0,1 n de tiocianat de amoniu (NH_4SCN)

Se cîntăresc (la balanţa farmaceutică) 9—10 *g* de tiocianat de amoniu (greutate echivalentă 76,11) se trece într-un balon cotat cu puţină apă şi se completează cu apă distilată la un litru.

Pentru stabilirea titrului soluţiei astfel obţinute, într-un balon Erlenmeyer se măsoară 20 *ml* soluţie de azotat de argint 0,1 *n*, se adaugă 200 *ml* apă, 5 *ml* soluţie de alaun feric (soluţie saturată la rece) şi 5—10 *ml* acid azotic pur (pînă la decolorare). Se titrează amestecul cu soluţia de tiocianat de amoniu, agitînd continuu. Titrarea se termină cînd apare o coloraţie roz persistentă, datorită formării $Fe(SCN)_3$ de culoare roşie. Titrul soluţiei de tiocianat de amoniu se calculează din relaţia:

$$T = \frac{76{,}11 \cdot n \cdot T_{AgNO_3}}{169{,}873 \cdot V}$$

unde: n = *ml* soluţie $AgNO_3$ luată în lucru
T_{AgNO_3} = titrul soluţiei de azotat de argint
V = *ml* soluţie tiocianat de amoniu folosit la titrare.

Prepararea şi stabilirea titrului unei soluţii 0,1 n de permanganat de potasiu ($KMnO_4$)

În mediu puternic acid (pH $\approx$ 0) echivalentul permanganatului de potasiu este de $\frac{KMnO_4}{5} = \frac{158{,}038}{5} = 31{,}607$ *g*. Pentru a pre-

Scanned with OKEN Scanner

para deci o soluție 0,1 *n* de permanganat de potasiu, se cîntăresc 3,2 *g* substanță, se dizolvă într-un litru de apă și se menține timp de o oră pe baia de apă la fierbere. După răcire se filtrează printr-o pîlnie cu placă poroasă (G_3 sau G_4) sau printr-un strat de asbest. În felul acesta este îndepărtat (MnO_2) bioxidul de mangan format prin reducerea permanganatului de potasiu în contact cu unele substanțe reducătoare (substanțe organice, grăsimea de pe pereții vaselor de sticlă etc.).

Dacă timpul ne permite, putem prepara soluția de $KMnO_4$ la rece, lăsînd-o să stea în acest caz 7—8 zile la întuneric, după care se filtrează după cum am arătat mai sus.

Pentru stabilirea titrului unei soluții de permanganat de potasiu se folosesc ca substanțe titrimetrice sau etalon acidul oxalic, oxalatul de sodiu, sarea Mohr, iodura de potasiu, ferocianura de potasiu etc.

Acidul oxalic ($H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$), greutate echivalentă 63,033. Ionul de oxalat este un reducător și reacționează ireversibil în modul următor: $C_2O_4^{2-} - 2e^- = 2CO_2$, reacția cu permanganatul de potasiu în mediu puternic acid (H_2SO_4) va fi deci următoarea:

$$2KMnO_4 + 5H_2C_2O_4 + 3H_2SO_4 = 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 10CO_2 + 8H_2O$$

Reacția se petrece la rece, dar viteza de reacție crește odată cu temperatura.

Practic se procedează în felul următor: se cîntăresc 0,20 *g* acid oxalic, se dizolvă în apă (25—30 *ml* apă distilată fiartă). Se adaugă apoi pentru 50 *ml* soluție, 15 *ml* H_2SO_4 4 *n* (17%) și se încălzește pe sită asbestată la 75°—80°C.

Soluția caldă se titrează cu permanganatul de potasiu al cărui titru vrem să-l stabilim. Deoarece la început reacția decurge lent, vom agita puternic și nu se adaugă o nouă cantitate de permanganat pînă cînd soluția nu se decolorează. Odată cu apariția sării de Mn^{2+}, oxidarea acidului oxalic are loc mai rapid și titrarea se execută în ritm obișnuit pînă cînd soluția se colorează în roz slab persistent (2—3 min.) (o picătură în exces).

Dacă în cursul titrării apare un precipitat brun de MnO_2, soluția trebuie acidulată mai mult.

Titrul soluției de permanganat se calculează din formula:

$$T = \frac{a \cdot 31{,}607}{n \cdot 63{,}033}$$

unde: a = *g* acid oxalic cîntărit
n = *ml* permanganat de potasiu utilizat la titrare.

Scanned with OKEN Scanner

Prepararea și stabilirea titrului unei soluții 0,1 n de tiosulfat de sodiu ($Na_2S_2O_3$)

Tiosulfatul de sodiu este un reducător conform reacției:

$$2S_2O_3^{2-} - 2e^- = S_4O_6^{2-} \qquad \text{(între pH 2 — 9)}$$

Pentru prepararea unei soluții de tiosulfat de sodiu se folosește $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$. Se cîntărește aproximativ 24,5—25,0 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ (greutate echivalentă 243,143) se trece cantitativ cu apă într-un balon cotat și se completează cu apă distilată la 1 litru. Pentru conservare se adaugă 1% alcool amilic care menține neschimbat titrul tiosulfatului de sodiu luni de zile.

Titrul tiosulfatului de sodiu se stabilește numai după 2—3 zile de la prepararea soluției, deoarece sub acțiunea acidului carbonic din apă, tiosulfatul poate trece în sulfit și sulf conform reacției:

$$Na_2S_2O_3 + H_2CO_3 = NaHSO_3 + NaHCO_3 + S$$

Stabilirea titrului soluției de tiosulfat de sodiu astfel obținută se face cu ajutorul unei soluții de iod preparată din iod pur, obținut prin 2—3 sublimări succesive.

Practic, într-un tubușor de cîntărire cu dop șlefuit, se introduc 2—2,5 *ml* soluție de KI 20%. Se cîntărește la balanța analitică. Cu ajutorul unei spatule de porțelan se introduc apoi 0,25—0,40 g iod și se astupă cu dopul. Are loc o reacție de dizolvare endotermă:

$$I_2 + KI = K[I_3]$$
$$I_2^0 + I^- = [I_3]^-$$

din care cauză tubușorul se răcește și vaporii de apă se condensează pe pereții tubușorului. Se așteaptă 2—3 minute, se cîntărește din nou, conținutul tubușorului se trece cantitativ cu apă într-un balon Erlenmeyer și se titrează cu tiosulfatul de sodiu al cărui titru vrem să-l stabilim, folosind ca indicator o soluție de amidon 0,5%. Are loc următoarea reacție:

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaI + Na_2S_4O_6$$

Titrul soluției de tiosulfat se exprimă în iod și se calculează din formula:

$$T = \frac{a \cdot 243{,}143}{n \cdot 126{,}904}$$

unde: $a = g$ iod sublimat cîntărit
$n = ml$ soluție de tiosulfat de sodiu folosit la titrare (greutatea echivalentă a iodului 126,904, greutatea echivalentă a tiosulfatului de sodiu 243,143).

Scanned with OKEN Scanner

Prepararea și stabilirea titrului unei soluții 0,1 n de iod

Fiind greu solubil în apă și soluția sa apoasă nefiind stabilă, iodul se dizolvă în KI sau NaI (cantitatea de KI sau NaI fiind de două ori cît a celei de iod), cînd are loc următoarea reacție:

$$I_2 + KI \rightleftharpoons K[I_3]$$

Complexul astfel format $K[I_3]$ este relativ stabil.

Pentru prepararea unei soluții de iod cu titru cunoscut se pleacă de la iod pur obținut prin sublimări succesive (2—3 sublimări). Pentru sublimare iodul se introduce într-un pahar uscat acoperit cu o sticlă de ceas în care se găsește apă rece. Se încălzește ușor pe sită. Iodul sublimează și se depune pe sticla de ceas sub formă de cristale violete. Operațiunea se repetă de 2—3 ori.

Se cîntărește apoi într-un tubușor cu dop șlefuit cantitatea de iod necesară (12,6904 pentru 1 litru de soluție 0,1 *n*) și se aduce cantitativ cu apă într-un balon cotat care conține o cantitate dublă (deci 25 *g*) de KI. Se agită pînă la dizolvare completă și se aduce cu apă la semn.

Pentru stabilirea titrului se folosește o soluție 0,1 *n* de tiosulfat de sodiu. Într-un balon Erlenmeyer se introduc 10—20 *ml* soluție de iod, se adaugă 20—30 *ml* apă distilată. Se titrează cu soluția de tiosulfat pînă la galben f. deschis, se adaugă 5 *ml* soluție de amidon 0,5% și se continuă titrarea agitînd puternic. O picătură de tiosulfat în exces va decolora net soluția. *Soluția de amidon nu se adaugă de la început!* Titrul soluției de iod se calculează după următoarea formulă:

$$T = \frac{n_1 T_1}{n}$$

unde: $n_1 = ml$ soluție de tiosulfat 0,1 *n*; T_1 = titrul soluției de tiosulfat; $n = ml$ soluție de iod.

Soluțiile 0,01 *n* se obțin prin diluarea soluțiilor 0,1 *n*. Titrul se stabilește din nou.

3.7. | Indicatorii

Indicatorii sînt substanțe care ne ajută la stabilirea punctului de echivalență. Indicatorii sînt de multe feluri, în cele ce urmează amintim numai indicatorii redox și acido-bazici.

Indicatorii redox sau de oxidoreducere, sînt substanțe a căror modificare este determinată de variația potențialului de oxido reducere a soluțiilor.

Scanned with OKEN Scanner

Indicatorii de pH sau acido-bazici sînt substanţe, care îşi modifică proprietăţile în funcţie de concentraţia ionilor de H^+ sau OH^-, respectiv de modificarea *pH*-ului soluţiilor. Indicatorii de *pH* trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:

Schimbarea de culoare să fie reversibilă.

Schimbarea de culoare să se producă imediat, deci într-un interval pe *pH* cît mai mic.

Indicatorul să fie suficient de solubil în apă pentru ca soluţia să fie suficient de colorată.

Să aibă o putere de colorare suficientă chiar pentru concentraţii mici de indicator ($10^{-4} - 10^{-5}$M), pentru a putea fi uşor observată.

Schimbarea de culoare să se producă la adausul unor cantităţi mici de acid sau bază pentru a nu provoca erori de titrare.

Indicatorul să fie stabil în soluţie în condiţiile de lucru: apa, lumina, oxigenul, bioxidul de carbon să nu-l altereze.

Indicatorii de *pH* se împart în mai multe categorii: de culoare, de fluorescenţă, de adsorbţie şi turbidimetrici. Ne vom referi numai la prima categorie.

3.7.1. INDICATORII ACIDO-BAZICI DE CULOARE

Aceşti indicatori îşi modifică culoarea în funcţie de *pH* şi fără excepţie sînt coloranţi organici.

Considerînd un indicator care este un acid slab disociat în soluţie apoasă:

$$HI \rightleftharpoons H^+ + I^-$$

constanta de disociere este:

$$K_{HI} = \frac{[I^-][H^+]}{[HI]} \text{ deci } \frac{K_{HI}}{[H^+]} = \frac{[I^-]}{[HI]}.$$

Deoarece formele I^- şi HI au culori diferite, este evidentă dependenţa culorii soluţiei de indicator de raportul $\frac{[I^-]}{[HI]}$, care la rîndul său depinde de $[H^+]$.

În cazul în care indicatorul este o bază slabă vom avea:

$$IOH \rightleftharpoons I^+ + OH^-$$

$$K_{IOH} = \frac{[I^+][OH^-]}{[IOH]} \text{ deci } \frac{K_{IOH}}{[OH^-]} = \frac{[I^+]}{[IOH]}$$

deci în acest caz culoarea va depinde de raportul $\frac{[I^+]}{[IOH]}$, care depinde, la rîndul său de $[OH^-]$.

Scanned with OKEN Scanner

Modificarea culorii indicatorului nu se produce la un anumit *pH*, ci într-un anumit interval de *pH*. Se numește deci *interval de viraj al indicatorului*, intervalul de *pH* în afara căriua nu se mai observă o schimbare a culorii indicatorului.

Există indicatori a căror domenii de viraj acoperă întreaga scară de *pH* de la 0—14. Acești indicatori se numesc *indicatori universali*.

În cele ce urmează dăm un tabel cu indicatorii de *pH* cei mai utilizați și domeniul lor de viraj:

TABEL NR. 1

Indicatori	*pH* 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Tropeolina OO	roşu galben													
Metiloranj		roşu portocaliu												
Roşu de metil			roşu galben											
Albastru brom timol				galben albastru										
Roşu cresol						galben roşu								
Fenolftaleină								incolor roşu						
Galben alizarină										galben violet				
Tropeolină O											galben brun			

Alegerea indicatorilor se face în funcție de *pH*-ul la care este atins punctul de echivalență.

3.7.2. PREPARAREA INDICATORILOR

Majoritatea indicatorilor se prepară în felul următor:

sarea de sodiu a indicatorului	0,1 *g*
apă distilată pînă la	100 *ml*
În cazul fenolftaleinei soluția este alcoolică: fenolftaleină	0,1 *g*
alcool etilic 50% pînă la	100 *m*

Indicatorul Wesselow este un amestec de doi indicatori.

Astfel:

a) albastru de metilen	0,1 *g*
apă	100 *ml*
b) roşu de metil	0,02 *g*
alcool etilic 50%	100 *ml*
c) albastru de metilen 0,1% apos	15 *ml*
roşu de metil 0,2% alcoolic	100 *ml*

Scanned with OKEN Scanner

Indicatori universali

Prin combinarea mai multor indicatori se obţin indicatori universali, adică indicatori care se pot aplica pentru o scară foarte întinsă de *pH*. Ei se folosesc pentru o primă orientare asupra *pH*-ului unei soluţii. Cei mai des folosiţi sînt:

1) Indicator universal după Bogen: 0,10 *g* fenolftaleină, 0,20 *g* roşu de metil, 0,40 *g* dimetilaminoazobenzol şi 0,50 *g* albastru de bromtimol se solvă în 500 *ml* alcool etilic 95%. Se adaugă NaOH 0,1 *N* pînă se obţine o culoare galbenă (*pH* = 6). Culorile pentru diferite *pH*-uri sînt arătate în tabelul de mai jos.

2) Indicator universal după Kolthoff: Se prepară un amestec din soluţiile alcoolice ale următorilor indicatori: 15 *ml* galbendimetil 0,1%, 5 *ml* roşu de metil 0,1%, 20 *ml* albastru de bromtimol 0,1%, 20 *ml* fenolftaleină 0,1% şi 20 *ml* timolftaleină 0,1%.

Determinarea aproximativă a *pH*-ului unei soluţii se face adăugînd 0,1 *ml* indicator la 10 *ml* soluţie. Culorile pentru diferitele *pH*-uri sînt trecute în tabelul 2.

TABEL NR. 2

pH	*Indicator Bogen*	*Indicator Kolthoff*
1	roşu — cireşiu	—
2	roz	roz
3	roşu-portocaliu	portocaliu-roşietic
4	portocaliu-roşietic	portocaliu
5	portocaliu	galben-portocaliu
6	galben	galben-lămîie
7	galben-verzui	galben-verzui
8	verde	verde
9	verde-albăsturi	verde albăstrui
10	albastru	violet
11	—	roşu-violet

Există şi soluţii indicator universal furnizate de diferite firme (Merck etc.).

S-au confecţionat şi *hîrtii indicator universal* prin îmbibarea unor fîşii din hîrtie de filtru cu indicatori. Sînt produse de diferiţi furnizori, la noi în ţară de Coop. Tehno-Metal Cluj. Scara lor de *pH* este între 1—10 sau pe domenii mai restrînse.

Hîrtiile indicator se folosesc numai pentru determinarea orientativă a *pH*-ului. Valorile obţinute pot diferi cu 0,5—1 unităţi de *pH*-ul real al soluţiei.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru determinarea exactă a *pH*-ului se folosesc *pH*-metre. Determinarea *pH*-ului unei soluţii în aceste condiţii constă în principiu în măsurarea unei forţe electromotrice. Valoarea *pH*-ului poate fi calculată fie direct din valoarea f.e.m. a pilei (electrodul de măsurare cufundat în soluţia de cercetat), fie din diferenţa dintre forţa electromotrice a pilei etalon (o soluţie tampon cu *pH*-ul cunoscut) şi cea a pilei cercetate (electrodul de măsurare mutat din soluţia tampon în soluţia cercetată). În ambele cazuri, măsurările forţei electromotrice trebuie să fie efectuate fără să treacă curent prin circuitul pilei, ceea ce este posibil în special prin folosirea aparaturii electronice.

pH-metrele sînt prevăzute de obicei cu două scări: o scară cu unităţi de *pH* şi o scară cu unităţi de tensiune (milivolţi).

Modul practic de lucru este indicat în prospectele care însoţesc aparatele respective. *pH*-metrele sînt însoţite de asemenea de soluţiile tampon de referinţă respective.

Prepararea soluţiilor tampon de referinţă (pt. *pH*-metru)

pH 4,01 la 38°C

Se usucă ftalat acid de potasiu ($HOOC—C_6H_4—COOK$) 4—6 ore la 100°—105°C (a nu se depăşi această temperatură), după care se răceşte în exicator. 1,021 g din acest ftalat se solvă în apă distilată şi se completează cu apă distilată la 100 *ml*. Se măsoară *pH*-ul la 25°C, 4,01. Înainte de întrebuinţare soluţia este adusă la 38°C.

pH 6,85 la 38°C

Se usucă fosfatul monobazic de potasiu KH_2PO_4 şi fosfat disodic Na_2HPO_4 în condiţiile indicate la ftalat.

0,340 g KH_2PO_4 şi 0,355 g Na_2HPO_4 se solvă în apă şi se completează la 100 *ml* cu apă distilată. Se măsoară *pH*-ul la 25°C 6,86. Înainte de întrebuinţare soluţia este adusă la 38°C. Această soluţie poate fi păstrată 3 luni dacă se pune în sticluţe mici, bine închise şi la rece.

pH 7,381 la 38°C

Se usucă KH_2PO_4 şi Na_2HPO_4 ca pentru tamponul cu *pH* 6,85. 0,1179 g KH_2PO_4 şi 0,4303 g Na_2HPO_4 se solvă în apă distilată şi se completează la 100 *ml* cu apă distilată. Soluţia poate fi păstrată în sticluţe mici la rece.

pH 9,18 la 25°C

0,381 g tetraborat de sodiu pur ($Na_2B_4O_7 \cdot 10\,H_2O$) se solvă şi completează cu apă distilată pînă la 100 *ml*. Această soluţie poate fi păstrată bine în frigider. Pentru o mai mare exactitate, soluţiile de referinţă se prepară în cantităţi mici şi se păstrează în frigider sub formă îngheţată.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Liteanu, C., *Chimie analitică*, Editura didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1969.
Treadwell, W. D., *Manuel de Chimie Analytique*, Paris, Dunard, 1947.

4. METODE FIZICO-CHIMICE DE ANALIZĂ ÎN LABORATORUL CLINIC

În prezent metodele fizico-chimice de analiză sînt folosite pe scară largă în laboratoarele clinice. Caracteristic acestor metode este folosirea unor instrumente de măsură şi înregistrare, de aceea mai sînt denumite şi *metode instrumentale*. Aceste aparate de măsură trebuiesc etalonate, operaţie în care stabilim o relaţie între proprietatea măsurată şi masa (concentraţia) constituientului pe care îl analizăm, folosind un etalon care conţine componentul căutat în proporţie cunoscută. Spre deosebire de metodele chimice (gravimetrice sau volumetrice) care nu necesită etalonare, fiind numite de aceea *metode absolute* sau independente, metodele fizico-chimice care necesită etalonare se numesc *relative sau neindependente*, exactitatea lor depinzînd de exactitatea şi precizia etalonării. Există însă şi metode fizico-chimice independente.

Metodele fizico-chimice se împart în metode de separare şi determinare propriu-zise. Metodele de separare sînt: cromatografia, schimbul de ioni, extracţia, distilarea, volatilizarea, electroliza, electroforeza. Metodele de determinare se pot împărţi în: metode optice, electrochimice, termice, magnetice, nucleare etc. dar delimitarea nu poate fi absolută fiindcă unele metode îndeplinesc simultan ambele funcţii. De exemplu, cromatografia a fost iniţial o metodă de separare, dar astăzi este folosită şi pentru determinări cantitative.

Se vor da cîteva noţiuni asupra metodelor spectroscopice şi cromatografice mai des folosite în laboratoarele clinice. Metodele electroforetice sînt descrise la separarea proteinelor serice.

4.1. Metodele spectroscopice (optice)

Metodele spectroscopice sînt bazate pe determinarea spectrelor de absorbţie şi de emisie. Din această categorie fac parte: colorimetria, fotometria (spectrofotometria), fotometria de flacără, spectroscopia de absorbţie atomică, analiza prin fluorescenţă.

Scanned with OKEN Scanner

4.1.1. BAZELE TEORETICE ALE METODELOR OPTICE

Radiaţiile electromagnetice se caracterizează prin lungime de undă şi frecvenţă, legate prin relaţia:

$$\lambda \nu = c \qquad (4.1)$$

unde λ este lungimea de undă, ν frecvenţa radiaţiei şi c viteza luminii ($3 \cdot 10^{10}$ *cm/sec.*).

Pe baza lungimii de undă radiaţiile electromagnetice se împart în mai multe domenii spectrale:

Denumirea domeniilor spectrale	*Lungimea de undă*	
	cm	*alte unităţi*
unde radio	$10^3 - 10^2$	10 — 1 *m*
microunde	$10 - 10^{-1}$	10 *cm* — 1 *mm*
infraroşu (*IR*) îndepărtat	10^{-2}	100 μm
infraroşu (*IR*) apropiat	$10^{-3} - 10^{-4}$	10 — 1 μm
vizibil	$4 \cdot 10^{-5} - 7 \cdot 10^{-5}$	400—760 *nm*
ultraviolet (*UV*) apropiat	10^{-5}	
ultraviolet (*UV*) îndepărtat	10^{-6}	10 *nm* = 100 Å
raze *X*	$10^{-7} - 10^{-8}$	1 *nm* — 1 Å
raze γ	$10^{-9} - 10^{-10}$	0,1—0,01Å

Majoritatea substanţelor prezintă proprietatea de a absorbi în mod selectiv radiaţii electromagnetice de o anumită lungime de undă, cu degajare simultană de căldură. Această proprietate constituie baza metodelor fotometrice de analiză. Din acest punct de vedere cele mai importante sînt radiaţiile cu lungime de undă cuprinsă între 200—2000 *nm*. Radiaţiile din domeniul vizibil au lungimea de undă de 400—760 *nm*. Radiaţiile din această regiune spectrală sînt înregistrate de ochiul omenesc. Lumina albă este un amestec de diferite culori, după cum se vede mai jos:

Culoarea	*Lungimea de undă (nm)*	*Culoarea complementară*
violet	400—450	galben—verde
albastru	450—500	galben
verde	500—570	roşu
galben	570—590	albastru
portocaliu	590—620	albastru—violet
roşu	620—750	verde—albastru

Scanned with OKEN Scanner

O soluție apare colorată ochiului omenesc fiindcă absoarbe toate radiațiile incidente, cu excepția celor care au culoarea respectivă. De ex., o soluție roșie absoarbe toate radiațiile vizibile cu lungime de undă mai scurtă, lăsînd să treacă doar lumina roșie. În fotometria de absorbție se folosesc radiații incidente complementare culorii soluției de analizat (filtre).

Radiația compusă dintr-o singură lungime de undă se numește *monocromatică*. Aceasta reprezintă un caz limită de care ne putem apropia, dar care nu se poate realiza. Astfel, linia Kr — 86 ($\lambda = 6{,}057\ \text{Å}$), a cărei lungime de undă este etalonul internațional de lungime, are un spectru cu lățimea de 0,0044 Å. Practic, prin radiație monocromatică se înțelege un domeniu foarte îngust de lungimi de undă izolat din spectrul unei surse de radiații, de ex. $450 \pm 0{,}1$ nm.

Legea lui Lambert—Beer

Dacă o lumină monocromatică cu intensitatea I traversează un mediu optic omogen, o parte din lumina incidentă este absorbită. Dacă notăm cu I intensitatea luminii după absorbție atunci raportul I/I_0 este numit *transmisie* sau *transmitanță*:

$$T = \frac{I}{I_0} \tag{4.2}$$

Dacă considerăm intensitatea incidentă $I_0 = 100\%$, I corespunde intensității reziduale în procente. În acest caz se vorbește de procente de transmisie sau transmisie procentuală:

$$T(\%) = \frac{I}{I_0} \cdot 100 \tag{4.3}$$

Dacă grosimea stratului (d) crește în progresie aritmetică, transmisia scade în progresie geometrică:

$$I = I_0 \cdot 10^{-kd} \tag{4.4}$$

sau sub formă logaritmică:

$$-\log T = k \cdot d \tag{4.5}$$

unde k se numește *coeficient de extincție* și reprezintă inversul grosimii stratului pentru care intensitatea radiației scade la 1/10 din valoarea inițială.

În măsurătorile fotometrice interesează gradul de micșorare a intensității luminii incidente, adică absorbția soluției:

$A = \frac{I_0 - I}{I_0}$ sau absorbția procentuală:

$$A(\%) = \frac{I_0 - I}{I_0} \cdot 100 \tag{4.6}$$

Scanned with OKEN Scanner

Evident că între transmisie şi absorbţie există relaţia: $A+T=1$ sau în procente: $A+T=100\%$.

Pentru evaluarea absorbţiei s-a introdus mărimea numită *extincţie* (sau *densitate optică* ori *absorbanţă*):

$$E = \log \frac{I_0}{I} \tag{4.7}$$

$$\text{Din (4.3) avem: } -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \cdot 100 \tag{4.8}$$

sau:

$$E = 2 - \log T(\%) \tag{4.9}$$

Aceasta este relaţia cu ajutorul căreia se poate transforma extincţia în transmisie sau invers. Ea se aplică în cazul aparatelor care dau rezultatele în procente din T (de ex. unele potenţiometre înregistratoare). În anexele de la sfîrşitul cărţii se dau tabelele de transformare a transmisiei în extincţie.

Cu cît grosimea stratului absorbant este mai mare şi extincţia este mai mare. Deci legea lui Bouguer-Lambert se poate scrie şi sub forma: $E = k \cdot d$.

Pe lîngă grosimea stratului trebuie să luăm în considerare şi numărul moleculelor absorbante din soluţie, deci concentraţia soluţiei. Beer a stabilit proporţionalitatea dintre extincţie şi concentraţie:

$$E = a \cdot C \cdot d \tag{4.10}$$

unde: a este un factor de proporţionalitate numit coeficient de extincţie în procente, sau absorbtivitate, C este concentraţia soluţiei în g %, iar d este grosimea stratului absorbant.

Coeficientul de extincţie în procente sau absorbtivitate este definită prin relaţia:

$$a = \frac{E}{C \cdot d}. \tag{4.11}$$

E este extincţia unei soluţii cu concentraţia de 1 g % citită într-o cuvă cu grosimea stratului de 1 *cm*.

Legile Bouguer-Lambert şi Beer se reunesc într-o singură lege, numită *legea lui Lambert-Beer*, care constituie baza măsurătorilor fotometrice:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon c d} \tag{4.12}$$

unde c este concentraţia exprimată în moli/litru. ε este coeficientul molar de extincţie, iar d este grosimea stratului absorbant.

Scanned with OKEN Scanner

Deci avem: $E = \varepsilon c \cdot d.$ şi $\varepsilon = \frac{E}{c \cdot d}$. (4.13)

De aici se poate vedea semnificaţia *coeficientului molar de extincţie*. Acesta reprezintă extincţia unei soluţii avînd concentraţia de 1 mol/litru (1 *M*), citită într-o cuvă de 1 *cm* (parcursul razei de lumină prin soluţie este de 1 *cm*). Coeficientul molar de extincţie reprezintă o constantă importantă a substanţei absorbante.

Între coeficientul molar de extincţie şi absorbtivitate există relaţiile:

$$\varepsilon = \frac{a \cdot GM}{10} \text{ sau } a = \frac{\varepsilon \cdot 10}{GM} \quad (4.14)$$

unde *GM* este greutatea moleculară a compusului cercetat.

După cum reiese din relaţia: $\varepsilon = E/c \cdot d$, coeficientul molar de extincţie se exprimă fie în $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, fie în $cm^2 \cdot mol^{-1}$, după cum luăm în considerare concentraţia molară a soluţiei (*M*) sau numărul de moli pe litru (*mol*/1000 cm³).

De exemplu, coeficientul molar de extincţie al $NADH_2$ este la 340 *nm*, $6{,}22 \cdot 10^3\ M^{-1} \cdot cm^{-1}$ sau $6{,}22 \cdot 10^6\ mol^{-1} \cdot cm^2$ iar la 366 *nm* este $3{,}30 \cdot 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$ sau $3{,}30^6 \cdot 10\ mol^{-1} \cdot cm^2$.

Deoarece în literatura străină se folosesc diferiţi termeni pentru noţiunile de mai sus considerăm utilă redarea acestora în limba originală:

Definiţie	*Denumire*	*Prescurtare*
$-\log T$	Extinction, optische Dichte, extinction, optical density, absorbance.	*E, OD, DO, A*
E/D	Coeficient d'extinction, absorbance index	*k*
$\frac{E}{(C\%) \cdot d}$	Coefficient d'extinction en pour-cent, specific extinction coefficient, absorptivity, absorbancy index	*a*, $E^{1\%}_{1\,cm}$, *E*
$\frac{E}{c \cdot d}$	Coefficient molaire d'extinction, mollecular extinction, coefficient, molar absorptivity, molar absorbancy index	ε, ε_M

Adesea este mai practic să se utilizeze coeficientul milimolar de extincţie (ε_{mM}) sau coefientul micromolar de extincţie ($\varepsilon_{\mu M}$). În literatura germană se calculează uneori coeficientul de extincţie considerînd concentraţia exprimată în *moli/ml* în loc de *moli*/1000 *ml*.

Scanned with OKEN Scanner

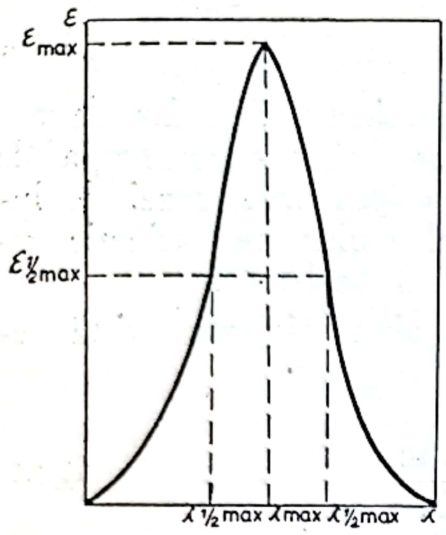


Fig. 5. Punctele caracteristice ale spectrului de absorbţie. Pe abscisă — lungimea de undă (λ); pe ordonată extincţia.

Coeficientul molar de extincţie variază în funcţie de lungimea de undă. Dacă reprezentăm grafic ε (sau *E*) în funcţie de lungimea de undă obţinem *spectrul* sau *curba de absorbţie* a substanţei colorate respective (fig. 5). Punctele caracteristice ale spectrului de absorbţie al unei substanţe colorate sînt următoarele: λ_{max} (la care corespunde ε_{max} sau ε), $\lambda_{1/2\,max}$ şi $\lambda'_{1/2\,max}$, (lungimile de undă la care corespunde jumătate din voloarea lui ε_{max}). Intensitatea coloraţiei se caracterizează prin ε_{max}, iar puritatea culorii prin lăţimea *benzii de absorbţie* ($\lambda_{1/2\,max} - \lambda'_{1/2\,max}$). Din punct de vedere analitic este avantajos ca banda de absorbţie să fie cît mai îngustă şi cît mai mare. Valoarea lui ε este cuprinsă între 5000 — 100.000.

Punctul de intersecţie a două curbe de absorbţie se numeşte isosbestic (punct de egală absorbanţă). Dacă o substanţă solvită există în două forme diferite aflate în echilibru şi care absorb la diferite lungimi de undă, atunci curbele de absorbţie ale substanţei luate la diferite valori ale *pH*-ului se întretaie într-un punct isosbestic. Existenţa şi numărul punctelor isosbestice sînt un indiciu a numărului de specii aflate în echilibru. Un singur punct isosbestic indică existenţa a două specii în echilibru.

Trasarea spectrului de absorbţie al unei substanţe se face măsurînd extincţia unei soluţii a acesteia din 10 în 10 *nm* începînd cu 230 *nm* (dacă substanţa absoarbe în *UV*) sau 400 *nm* (dacă absoarbe în vizibil). Este necesar un spectrofotometru pentru a obţine radiaţiile monocromatice. Aparatele perfecţionate înregistrează automat spectrul de absorbţie.

Determinarea concentraţiei substanţelor pe baza reacţiilor de culoare se utilizează de multă vreme în practica laboratorului clinic. Pentru aceasta există mai multe posibilităţi: 1. substanţa cercetată are o culoare proprie în lumina vizibilă (hemoglobina, carotenoidele) sau absoarbe razele ultraviolete (proteinele) sau infraroşii (steroizii); 2. substanţa formează cu un reactiv o combinaţie colorată (colesterolul, amoniacul); 3. substanţa eliberează o substanţă colorată prin adăugarea reactivului; 4. substanţa de analizat distruge o substanţă colorată adăugată.

În toate acestea trebuie să fie îndeplinite condiţiile: 1) culoarea să depindă numai de substanţa de analizat (specificitate); 2) culoarea să fie cît mai stabilă; 3) dezvoltarea culorii să fie independentă de

Scanned with OKEN Scanner

condiţiile atmosferice; 4) legea lui Lambert-Beer să fie valabilă; 5) măsurarea intensităţii culorii să se facă cunoscînd proprietăţile spectrale ale compusului colorat, astfel ca, pe cît posibil, să se lucreze la λ_{max}.

Metodele utilizate la determinări bazate pe absorbţia radiaţiei luminoase le putem clasifica în două categorii, după lăţimea benzii spectrale utilizate, respectiv tehnica de măsurare folosită. Aceste două categorii sînt metodele colorimetrice şi fotometrice.

4.1.2. | METODELE COLORIMETRICE

Metodele colorimetrice se bazează pe compararea absorbţiei a două soluţii de diferite concentraţii ale aceleiaşi substanţe colorate. Măsurătorile se fac într-un domeniu larg al spectrului, eventual în lumină albă, rezultatele fiind independente de puritatea spectrală a luminii utilizate. În colorimetrie nu se fac determinări de extincţie, ci numai comparări vizuale (colorimetrie vizuală) sau fotoelectrice (fotocolorimetrie).

Practic, se lucrează cu o soluţie de concentraţie cunoscută (C_1) a substanţei de dozat şi cu soluţia a cărei concentraţie (C_2) vrem să o determinăm. Se egalizează intensitatea luminii transmisă prin soluţia C_1 cu aceea transmisă prin soluţia C_2, variind grosimea stratului absorbant. În momentul egalării intensităţilor transmise prin ambele soluţii avem aceeaşi absorbanţă, deci:

$$A_1 = \varepsilon C_1 d_1 = A_2 = \varepsilon C_2 d_2$$

de unde:

$$C_2 = C_1 \frac{d_1}{d_2} \qquad (4.15)$$

unde d_1 este grosimea stratului de soluţie cu concentraţia C_1 şi d_2 este grosimea stratului de soluţie cu concentraţia C_2. Aceasta este *legea de bază a colorimetriei:* la egalitate de absorbanţă, grosimea stratului absorbant este invers proporţională cu concentraţia respectivă.

Actualmente aceste măsurători sînt considerate prea imprecise de aceea nu mai sînt utilizate decît în laboratoarele slab dotate. Dintre tipurile de colorimetre nu vom descrie decît *colorimetrul Duboscq* (fig. 6).

Fascicolele de lumină după reflexia pe oglindă sînt îndreptate vertical şi ajung, după ce străbat două cuve şi două baghete de sticlă, în ocular, unde luminează cîte un semicerc. Baghetele de sticlă pot fi mişcate în sus sau în jos cu ajutorul unor şuruburi, în faţa o două rigle

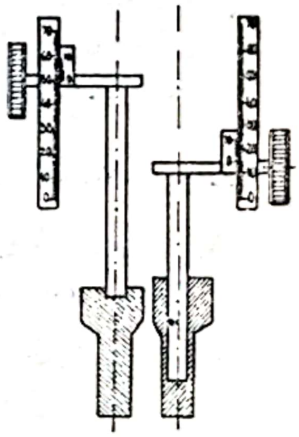


Fig. 6. Schema colorimetrului Duboscq (explicaţii în text)

Scanned with OKEN Scanner

gradate în milimetri. Înălțimea la care se află bagheta corespunde grosimii stratului (d). Odată cu cilindrele se deplasează și vernierele. Vernierul ne permite să citim cu o precizie de 0,1 *mm*. În acest scop vom citi pe rigla gradată înălțimea la care se găsește diviziunea 0 de pe vernier. În cazul cînd 0 nu coincide exact cu o diviziune de pe riglă citim diviziunea de dedesubt și apoi căutăm care din diviziunile vernierului coincide cu o diviziune de pe riglă. Să presupunem că 0 era deasupra diviziunii 18 și că diviziunea 7 de pe vernier coincide exact unei diviziuni de pe riglă. Înălțimea în acest caz este 18,7.

Pentru a afla corecția aparatului punem în cele două pahare aceeași soluție colorată, fixăm înălțimea unei baghete la 20 *mm* și apoi citim înălțimea celei de a doua după ce am adus semicercurile din ocular la egalitate de culoare. Această operație se repetă de 4—5 ori însemnînd înălțimile găsite. Să presupunem că s-au găsit următoarele valori: 20,3; 20,2; 20,4; 20,4; 20,2.

Media rezultată este de 20,3 corecția fiind —0,3 *mm*. Aceasta va trebui scăzută totdeauna din înălțimile citite pentru această baghetă. Practic se ia pentru soluția cu concentrație cunoscută (soluție standard) o înălțime dată (de ex. 20 *mm*) și vom potrivi apoi înălțimea celeilalte baghete pînă la obținerea egalității de culoare a celor două semicercuri în ocular. Repetăm de 3—4 ori această operație luînd media valorilor găsite, apoi calculăm concentrația necunoscută folosind formula dată mai înainte.

Între d_1 și d_2 nu trebuie să fie o diferență mai mare de 1/3. Trebuie avut grijă ca totdeauna cilindrii de sticlă și paharele să fie perfect curățite.

Pentru alte modele de colorimetre dăm indicația bibliografică: 1. Manta I., Ciplea Al., *Metodele laboratorului clinic*, Cartea Românească, Cluj, 1947; 2. Ranke, F., Thiele, K., *Physikalisch-chemische Methoden in Klinische-Laboratorium*, Volk und Gesundheit, Berlin, 1969; 3. Pogany, I., Banciu, M., *Metode fizice în chimia organică*, Ed. științifică, București, 1972.

4.1.3. | METODELE FOTOMETRICE

Metodele fotometrice se bazează pe determinarea valorii absolute a extincției, concentrația necunoscută calculîndu-se pe baza ecuației: $E = \varepsilon c \cdot d$.

Măsurătorile trebuiesc efectuate în condițiile în care legea Lambert-Beer este respectată. Aceasta este valabilă doar într-un domeniu limitat de concentrații, stabilit prin efectuarea unei curbe de etalonare. După efectuarea ei, măsurătorile se fac în condițiile în care s-a făcut etalonarea determinînd extincția probei față de o cuvă de referință ce

Scanned with OKEN Scanner

conţine reactivii fără componentul de analizat (proba în alb). Se raportează apoi extincţia la curba de etalonare calculînd cantitatea de component de analizat ce corespunde extincţiei citite.

Aparatura

Se pot folosi fotometre vizuale sau fotoelectrice.

Dintre fotometrele vizuale vom descrie *fotometrul Pulfrich*, a cărui schemă de funcţionare este redată în fig. 7. De la sursa de lumină se desfac două fascicule de raze simetrice: acestea întîlnesc înaintea ocularului un filtru care lasă să treacă numai razele cu o lungime de undă determinată şi ajung în ocular, în care, tamburele fiind puse la 0, vedem două semicercuri iluminate la fel. În drumul lor fasciculele străbat cuvele. Dacă în cuve de aceeaşi grosime punem: într-una soluţia de măsurat şi în cea de a doua solventul şi reactivii (proba în alb), ocularul ne va arăta o inegalitate de iluminare a celor două semicercuri, din cauza deosebirii de absorbţie. Pentru a le readuce la egalitate vom învîrti tamburul din partea solventului. Citim extincţia direct pe tambur. Repetăm de cîteva ori această operaţie luînd media extincţiilor citite.

Grosimea cuvelor trebuie luată astfel ca extincţiile să aibă valori între 0,2—0,8. Este bine ca după o determinare să schimbăm locul cuvelor (una în locul celeilalte) şi să repetăm măsurătoarea întocmai ca înainte. Luăm media valorilor medii găsite. În acest fel extincţia este independentă de orice asimetrie optică.

Odată stabilită extincţia E_1 a unei soluţii cu concentraţia cunoscută C_1, vom putea afla o concentraţie necunoscută C_2 determinîndu-i extincţia E_2 corespunzătoare, cu ajutorul formulei:

$$C_2 = C_1 \cdot \frac{E_2}{E_1}.$$

Bineînţeles că amîndouă extincţiile trebuie determinate pentru aceeaşi grosime a cuvei şi aceeaşi lungime de undă (acelaşi filtru).

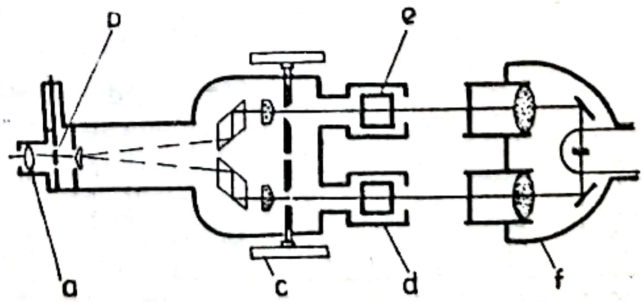


Fig. 7. Schema unui fotometru Pulfrich. a) ocular; b) filtru; c) tambur de măsură; d) port-cuvă; e) cuvă; f) lampă fotometrică.

Scanned with OKEN Scanner

Schema de principiu a unui fotometru cu celulă fotoelectrică este redată în fig. 8. Lumina emisă de o sursă de lumină este concentrată printr-un sistem optic, apoi este descompusă, selecționîndu-se o bandă de radiații care trece prin proba de analizat. Lumina care traversează soluția cade pe o celulă fotoelectrică iar curentul generat este măsurat cu un instrument de măsură.

Aparatele se clasifică pe baza sursei de lumină și a lățimii benzii spectrale pe care o selectează.

a. Fotometre cu lampă de wolfram și filtre (de ex. fotometrul I.O.R., fotometrul FEK). Sursa de radiații este un bec cu filament de wolfram, iar cu ajutorul unor filtre de sticlă colorată sînt selectate benzi de radiații destul de late. Fotocurentul produs de radiațiile care trec prin cuvă este compensat pe cale electrică, galvanometrul aparatului servind ca instrument de zero.

Aparatele de acest tip sînt adecvate măsurării reacțiilor de culoare în care compusul care se fotometrează are o bandă lată de absorbție. Cu o curbă de etalonare corect întocmită se obțin rezultate precise.

b. Fotometre cu linii spectrale. Sursa de lumină este reprezentată de lămpi cu descărcare în gaz (lampă de mercur sau de cadmiu). Acestea emit radiații discontinue; dintre liniile spectrale emise se izolează cu ajutorul unor filtre de interferență radiații monocromatice cu lărgimea benzii de cca. 1 *nm*. Aceste aparate sînt convenabile pentru toate analizele chimice din laboratoarele clinice. Redăm mai jos liniile emise de mercur și cadmiu, care se pot izola cu ajutorul filtrelor:

Hg	*Cd*
313	
	326
334	
365	
404/407	
435/436	
	468
	480

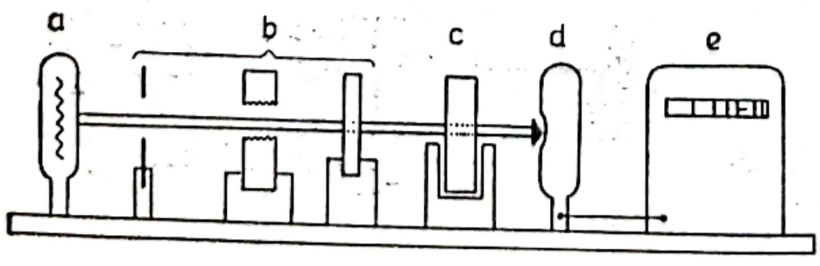


Fig. 8. Schema de construcție a unui fotometru cu celulă fotoelectrică. a) Sursa de lumină; b) sistem optic (ecran-diafragm, filtre), c) cuva; d) celula fotoelectrică; e) aparat de măsură galvanometru.

Scanned with OKEN Scanner

Hg	*Cd*
492	
	509
546	
577/579	
623	
	644
691	
772	
1014	

c. Spectrofotometrele (de ex. Spekol, VSU-1, VSU-2). Radiaţiile luminoase sînt descompuse cu ajutorul unei prisme (VSU-1, VSU-2) sau a unei reţele de difracţie (Spekol) în radiaţii monocromatice. Se pot obţine astfel radiaţii monocromatice de orice lungime de undă. Aparatele de acest tip sînt mai scumpe şi sînt indicate pentru măsurători în ultraviolet, trasarea spectrelor, determinarea unor compuşi coloraţi care au benzi de absorbţie înguste. Pentru citirea de rutină a absorbţiei ele pot fi înlocuite cu aparate mai ieftine (fotometre FEK, IOR etc.).

În cazul aparatului Spekol, pentru citirea extincţiei se foloseşte metoda deviaţiei. Se aşază succesiv în calea luminii martorul şi apoi proba şi se citeşte deplasarea acului indicator.

În cazul spectrofotometrelor VSU-1, VSU-2, fotocurentul se determină prin compensare potenţiometrică şi se raportează la fotocurentul cuvei martor, determinat în condiţii similare (lungime de undă şi fantă). Aceste aparate permit adaptarea unui înregistrator.

Efectuarea măsurătorilor fotometrice

În practica măsurătorilor fotometrice se poate lucra în trei feluri: cu ajutorul unei curbe de etalonare, cu ajutorul unui standard la fiecare serie de determinări şi pe baza coeficientului molar de extincţie (folosind direct legea Lambert-Beer).

a) Curba de etalonare urmăreşte stabilirea corelaţiei dintre extincţie şi concentraţie pe domeniul în care legea Lambert-Beer este aplicabilă. Practic, se face o soluţie etalon de concentraţie cunoscută a substanţei de analizat şi se efectuează reacţia de culoare cu diferite cantităţi din soluţia etalon, exact în condiţiile în care se va lucra şi cu probele de analizat. Se citesc extincţiile faţă de o cuvă martor, ce conţine reactivii cu excepţia substanţei de analizat. Se reprezintă grafic curba de etalonare pe hîrtie milimetrică, trecînd pe ordonată extincţiile, iar pe abscisă cantitatea de substanţă. În cazul în care se lucrează

Scanned with OKEN Scanner

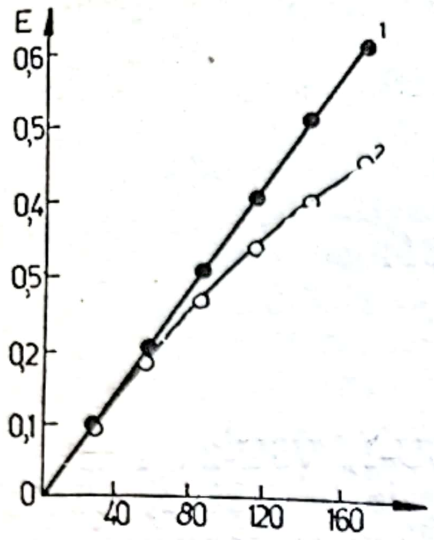


Fig. 9. Exemplu de etalonare în cazul folosirii radiaţiilor monocromatice (1) şi nemonocromatice (2). Pe abscisă — concentraţia substanţei de analizat; pe ordonată extincţia.

corect se obţine o dreaptă care trece prin origine. În afara domeniului de liniaritate legea Lambert-Beer nu mai este respectată şi în acest domeniu nu se va lucra.

Există două categorii de cauze care produc îndepărtarea de la domeniul de valabilitate al legii: cauze chimice şi cauze fizice. Printre *cauzele chimice* putem considera concentraţia prea mare a substanţei de analizat. Se poate realiza respectarea legii Lambert-Beer lucrînd cu o cantitate mai mică de probă de analizat, mărind volumul final al reacţiei de culoare sau modificînd concentraţia reactivilor. Dacă nici în aceste condiţii nu se respectă legea Lambert-Beer, se poate lucra satisfăcător efectuînd o curbă de etalonare la fiecare serie de analize, luînd în calcul valoarea cea mai apropiată de extincţia probei. *Cauzele fizice* sînt reprezentate în primul rînd de utilizarea radiaţiilor nemonocromatice. Se observă din fig. 9 că folosind radiaţii monocromatice, curba de etalonare se menţine lineară pe un domeniu mai mare de concentraţii.

Aşa cum s-a spus pentru calcularea rezultatelor unei analize se raportează extincţia la curba de etalonare şi se obţine rezultatul pe probă. Se poate însă calcula şi un factor al curbei de etalonare după formula: $f = \frac{\Sigma C_i}{\Sigma E_i}$, aducînd extincţiile ($E_i$) probelor cu diferite concentraţii (C_i). Concentraţia unei probe necunoscute va fi: $C_x = E_x \cdot f$

De exemplu, la dozarea fosforului anorganic seric se face o curbă aşa cum se descrie la: *Analiza sîngelui.* Se obţin datele următoare:

						Total
ug fosfat:	1	2	4	5	6	18
E_2 *cm* (FEK)	0,046	0,095	0,192	0,235	0,275	0,843

Prin urmare: $f = 18/0{,}843 = 21{,}3$. Concentraţia unei probe necunoscute va fi: $E_x \cdot 21{,}3$/*ug* fosfat/probă.

b) Calculul rezultatelor folosind un standard. Pentru a lucra în modul cel mai corect se fac patru determinări:

B = proba în alb (reactivii): conţine toţi reactivii şi apă distilată, în volum egal cu cel al probei de analizat şi al standardului.

Scanned with OKEN Scanner

P = proba de analizat: conţine reactivii şi materialul de analizat.

S = standardul: conţine reactivii şi soluţia standard.

A = conţine numai materialul de analizat fără reactivi de culoare.

Dacă se citesc extincţiile faţă de o cuvă cu apă distilată avem:

$$E_{p\ \text{corectată}} = E_p - E_A - E_B$$
$$E_S\ \text{corectată} = E_S - E_B$$

Dacă notăm cu C_p concentraţia probei şi cu C_S concentraţia standardului, avem relaţia de calcul (pe baza legii Lambert-Beer):

$$C_P = \frac{E_{P\ \text{corectată}}}{E_{S\ \text{corectată}}} \cdot C_S \qquad (4.16)$$

Practic proba A este necesară doar cînd materialul de analizat este colorat. De asemenea, se pot citi extincţiile probei şi ale standardului faţă de proba în alb (B). Dacă se foloseşte aceeaşi pipetă pentru standard şi pentru probă, nu este necesară etalonarea precisă a pipetei.

c) *Calculul rezultatelor cu ajutorul coeficientului de extincţie.* Dacă sînt îndeplinite condiţiile următoare se poate renunţa la folosirea standardului: substanţa de analizat este colorată sau produsul colorat este în relaţie stoechiometrică şi reproductibilă cu substanţa de analizat; legea lui Beer este valabilă; se utilizează pipete perfect etalonate; se folosesc cuve cu pereţii plani-paraleli cu grosimea stratului, cunoscută.

În aceste condiţii se pot folosi următoarele formule:

$$C = \frac{E_p}{a \cdot d} \cdot \text{diluţia probei} \qquad (4.17)$$

unde: a este coeficientul de extincţie în procente, d este grosimea stratului absorbant. E_p este extincţia probei şi C concentraţia substanţei în $g/100\ ml$;

$$c = \frac{E_P}{\varepsilon \cdot d} \cdot \text{diluţia probei} \qquad (4.18)$$

unde: ε este coeficientul molar de extincţie, iar c este concentraţia molară ($mol/1000\ ml$) a substanţei de analizat.

De exemplu, o soluţie de $NADH_2$ are o densitate optică de 0,400 la 340 nm:

$$c = \frac{0{,}400}{6{,}22 \times 10^3 \times 1} M = 6{,}43 \cdot 10^{-5} M$$

Scanned with OKEN Scanner

sau:

$$c = \frac{0{,}400}{6{,}22 \cdot 10^6 \cdot 1}\ mol/ml = 6{,}43 \cdot 10^{-8}\ mol/ml$$

(s-au folosit ambele modalităţi de exprimare a coeficientului molar de extincţie: $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, respectiv $mol^{-1} \cdot cm^2$).

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique, théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967. Pogany, I., Banciu, M., *Metode fizice în chimia organică*, Ed. ştiinţifică, Bucureşti, 1972.

4.1.4. | FOTOMETRIA DE FLACĂRĂ

Colorarea flăcării de către sărurile unor metale a fost cunoscută din secolul trecut, ducînd la descoperirea cesiului şi rubidiului (Kircchoff şi Bunsen, 1860). Aplicarea în analiza cantitativă a fotometriei de flacără a devenit posibilă după ce, în 1930, Lundegardh reuşeşte să construiască un pulverizator şi s-a elaborat teoria metodei. Introducerea fotometriei de flacără în laboratoarele clinice reprezintă una dintre achiziţiile importante ale ultimilor ani. Deşi se cunoaşte din 1920 importanţa tulburărilor metabolismului electroliţilor, abia după ce fotometria de flacără a oferit posibilitatea dozării rapide şi precise a Na şi K s-au putut diagnostica şi trata cu succes aceste tulburări.

Principiu

La încălzirea în flacără a soluţiei pulverizate a unei sări metalice se produc mai multe fenomene: apa se evaporă, iar particulele solide se topesc şi se evaporă. În stare gazoasă sarea se află sub formă de molecule, care se descompun în atomi (atomizare). În flacără atomii sînt excitaţi, trecînd de la starea energetică iniţială la una mai înaltă (electronii trec de pe un nivel iniţial pe unul superior). La reîntoarcerea electronului pe nivelul iniţial, energia absorbită este eliberată şi emisă sub formă de lumină cu o anumită lungime de undă caracteristică fiecărui element. În condiţii bine precizate intensitatea radiaţiei emise este proporţională cu concentraţia atomilor din probă. Fotometria de flacără face deci parte dintre metodele spectroscopice de emisie.

Energia disponibilă în flacără fiind relativ mică, se obţin numai linii cărora le corespunde o energie de excitaţie scăzută. Acestea sînt în general linii de rezonanţă ale stării fundamentale. În spectrul de emisie al Na, K şi Ca, elemente care se dozează în laboratorul clinic

Scanned with OKEN Scanner

prin fotometria de flacără se distinge o bandă de emisie largă, comună tuturor atomilor, peste care se suprapun benzile înguste individuale.

Practic, soluţia probei se introduce cu ajutorul unui pulverizator în curentul de gaz care alimentează flacăra. Lumina flăcării (radiaţia emisă) este descompusă cu un monocromator, determinîndu-se apoi intensitatea unor linii în prealabil alese, proporţională cu concentraţia. Metoda este aplicabilă numai pentru dozarea elementelor care au energie de excitare scăzută (metalele alcaline şi alcalino-pămîntoase).

Aparatura

Fotometrul de flacără se compune din următoarele elemente principale (fig. 10): sistemul de aspiraţie cu pulverizatorul, arzătorul, sistemul optic pentru izolarea luminii monocromatice de o lungime de undă determinată, o fotocelulă şi un sistem indicator. Soluţia de măsurat este aspirată şi pulverizată. Aerosolii împreună cu gazul combustibil formează amestecul gazos care arde în flacără.

Selectarea din spectrul de emisie al lungimii de undă dorite, se poate realiza prin filtre (fotometre de flacără cu filtre) sau cu o prismă

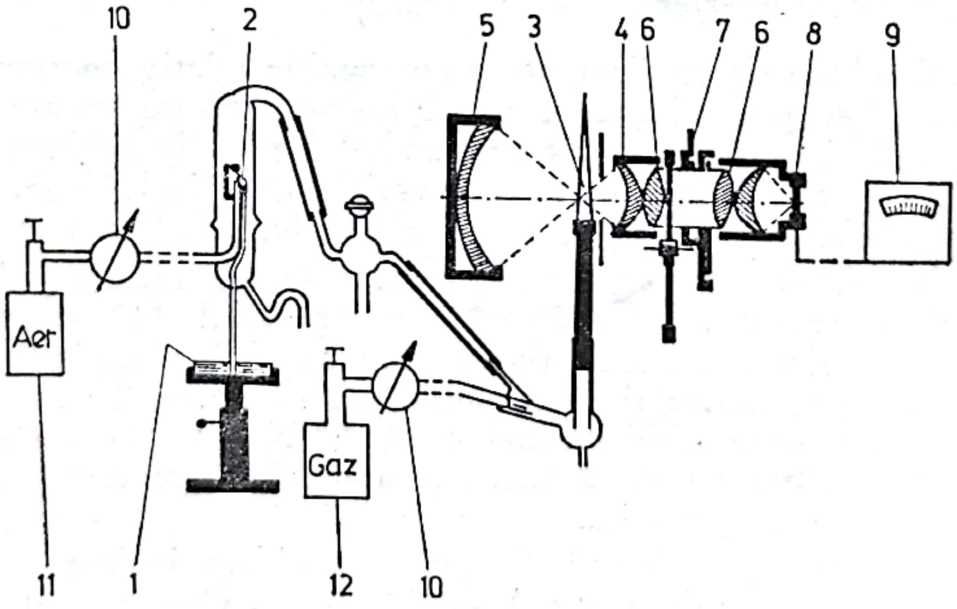


Fig. 10. Schema fotometrului de flacără Zeiss: 1) soluţia de analizat; 2) pulverizatorul, 3) flacăra; 4, 5, 6, 7 sistemul optic; 8) receptorul; 9) galvanometrul; 10) manometrul; 11) aer comprimat; 12) butelie cu gaz.

Scanned with OKEN Scanner

ori rețea de difracție (spectrofotometre). Din prima categorie de aparate face parte fotometrul de flacără C. Zeiss-Jena, iar din a doua categorie spectrofotometrul VSU-2, care are o anexă pentru fotometria de flacără.

Alegerea condițiilor de lucru

1) Temperatura flăcării este importantă fiindcă energia de excitare a atomilor diferă. Sodiul și potasiul sînt cei mai ușor excitați, fiind suficientă o flacără de propan-aer. Pentru Ca și Mg sînt necesare temperaturi mai ridicate, de aceea se utilizează flacăra de acetilenă ori de hidrogen.

2) Alegerea lungimii de undă pentru măsurare se face în primul rînd în funcție de specificitate și numai în al doilea rînd în funcție de intensitatea absolută a radiației emise. Se aleg acele lungimi de undă la care benzile de emisie ale atomilor prezenți nu se suprapun.

3) Concentrația elementelor de analizat în probă impune utilizarea unei diluții potrivite, astfel ca să existe o relație directă între emisie și concentrație.

Condițiile optime de măsurare depind de tipul de fotometru cu care se lucrează (indicate în prospect). Condițiile trebuie respectate și în plus este necesar să se controleze zilnic rezultatele cu o soluție standard sau un ser de control.

Factori care interferează în măsurători

Dacă soluția de analizat are o compoziție relativ constantă, ca în cazul serului, se poate lucra în condiții standardizate în așa fel încît să nu ne îndepărtăm prea mult de rezultatul real. În schimb, în cazul urinei, a cărei compoziție este foarte variabilă, pericolul unor rezultate false este foarte mare. Se pot clasifica interferențele în trei categorii:

a) *Interferențe optice.* La concentrații mari metalele dau benzi largi (de ex. sodiul între 360—602 *nm*, potasiul 340—570 *nm*. De aceea, trebuie aleasă concentrația la care se obțin imaginile spectrale cele mai corespunzătoare și să se încerce să se izoleze benzile cele mai tipice. În cazul superpoziției benzilor Mg și Na la 285 *nm* este necesară izolarea substanței de analizat și apoi să se procedeze la măsurarea fotometrică propriu-zisă.

b) *Interferența cationică.* Se poate considera ionizarea moleculelor ca un fenomen de disociere: $A = A^+ + e^-$. Constanta de echilibru are valoarea:

$$K = \frac{[A^+][e^-]}{[A]}$$

Scanned with OKEN Scanner

O creştere a densităţii electronilor scade ionizarea şi în consecinţă creşte numărul atomilor excitabili şi emisia. Acest pericol există mai ales atunci cînd alţi atomi sînt prezenţi în concentraţii variabile. Se poate micşora interferenţa cationică adăugînd metalul care interferează în cantităţi mari, astfel încît să împiedice total ionizarea. Astfel, în cazul determinării K şi Ca din ser interferează Na, care se află în concentraţie mult mai mare. De aceea la stabilirea curbelor de etalonare pentru dozarea K şi Ca din ser, la soluţia etalon trebuie adăugat Na în exces.

c) *Interferenţa anionică.* Se bazează pe formarea de combinaţii greu volatile ale unor anioni cu atomii de măsurat. Se produce în flăcările „reci". De ex. fosfatul interferează în determinarea calciului. Interferenţa anionică poate fi contracarată, pe de o parte lucrînd cu o flacără foarte caldă, iar pe de altă parte adăugînd în exces anionul care interferează.

Deoarece în fotometria de flacără, rezultatul analizei se bazează pe o etalonare a aparatului cu o soluţie standard, proprietăţile fizice ale soluţiei standard şi ale probei de analizat trebuie să fie identice. Tensiunea superficială are un efect mare asupra pulverizării şi deci asupra rezultatului măsurătorii. De aceea în cazul serului unii autori recomandă adăugarea la diluţia standard a unui agent tensioactiv.

BIBLIOGRAFIE

Buriel-Marti, F., Ramirez-Munoz, J., *Flame Photometry*, Elsevier, New York, Amsterdam, 1957; Dean, J. A., *Flame Photometry*, McGraw-Hill, New York, 1960; Hermann, R., Alkemade, C. Th. J., *Flammen Photometrie*, 2 Aufl., Springer, Berlin, 1966; Kekedi, L., *Analiză fizico-chimică*, Ed. did. şi ped., Bucureşti, 1969; Mavrodineanu, R., Boiteaux, R., *L'Analyse quantitative par la flamm.*, Masson, Paris, 1954.

4.1.5. | SPECTROSCOPIA DE ABSORBŢIE ATOMICĂ

A fost introdusă de A. Walsh în 1955, ca o variantă a fotometriei de flacără şi a cunoscut apoi o rapidă răspîndire.

Principiu

După cum s-a văzut în cazul fotometriei de flacără, o parte din atomi sînt excitaţi la un nivel energetic superior emiţînd apoi prin revenirea la nivelul iniţial o radiaţie corespunzătoare liniei de rezonanţă. Dar majoritatea atomilor rămîn în starea fundamentală. În spectroscopia de absorbţie atomică se trece prin flacără o radiaţie avînd

Scanned with OKEN Scanner

frecvenţa liniei de rezonanţă. Atomii rămaşi în starea fundamentală absorb această radiaţie (pe care ar emite-o dacă ar fi excitaţi) şi absorbţia este proporţională cu concentraţia atomilor în flacără şi grosimea stratului străbătut de radiaţia monocromatică.

Avantaje

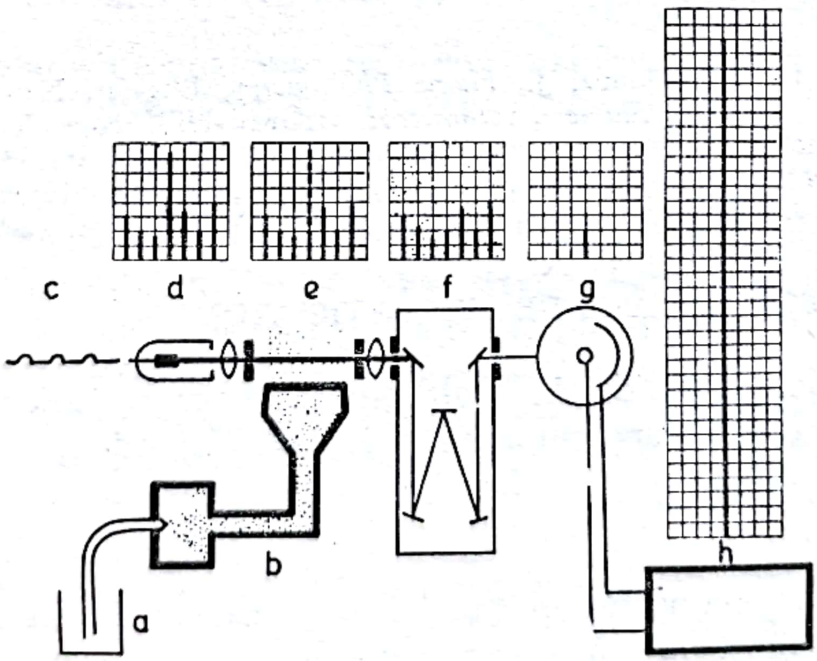
1. Specificitate foarte mare fiindcă radiaţia cu o anumită lungime de undă nu poate fi absorbită decît de elementul căreia îi este caracteristică (ca linie de rezonanţă). De aceea interferenţele spectrale apar foarte rar.

2. Intensitatea absorbită fiind proporţională cu numărul atomilor neexcitaţi şi cu grosimea stratului, temperatura flăcării şi energia de excitaţie a atomilor prezintă importanţă mai mică decît la fotometria de flacără. Stabilitatea flăcării are însă importanţă pentru reproductibilitatea rezultatelor.

Aparatura

Spectrofotometrul de absorbţie atomică se compune din următoarele componente (fig. 11):

1. Sursa de radiaţie care emite linia de rezonanţă a elementului de determinat. Emisia lămpii este modulată pentru ca detectorul să înregistreze doar lumina emisă de lampă nu şi cea emisă din flacără (de



GFig. 11. Schema unui spectrofotometru de absorbţie atomică. a) aspirare; b) atomizare; c) modulare; d) emisie, e) absorbţie; f) izolare; g) detectare, h) amplificare.

Scanned with OKEN Scanner

către atomii excitaţi). Se folosesc în general lămpi de descărcare cu catod tubular. Catodul trebuie să fie făcut din elementul pe care vrem să-l determinăm. Sînt şi lămpi care au catozi făcuţi din aliaje astfel că pot fi folosite pentru determinarea elementelor din care este făcut aliajul.

2. Atomizorul are rolul de a trece elementul de analizat sub formă de atomi. Se folosesc atomizoare de flacără sau cu cuptor de grafit.

a) Atomizoarele de flacără sînt alimentate cu amestecuri de gaze: aer-acetilenă; aer-hidrogen; aer-propan; N_2O-acetilenă etc. Proba de analizat este introdusă în atomizor prin aspirare şi pulverizare.

b) Atomizorul un cuptor de grafit este încălzit cu curent electric după un program reglabil. Pentru a feri cuptorul (tubul de grafit), de ardere se folosesc gaze de protecţie. În general, ca gaz de protecţie se foloseşte argonul sau azotul. La aparatele dotate cu atomizor cu cuptor de grafit se pot analiza probe lichide sau solide. Probele lichide se introduc cu ajutorul unor seringi speciale, iar probele solide cu pensete speciale.

3. Monocromatorul izolează linia de rezonanţă şi o focalizează asupra detectorului.

4. Fotomultiplicatorul detectează şi amplifică intensitatea luminii care cade asupra sa.

Practic, aparatul este ajustat la extincţia zero cînd o soluţie martor este vaporizată în probă şi lumina lămpii ajunge la fotomultiplicator. Cînd se introduc soluţii conţinînd specii absorbante o parte din lumină este absorbită şi rezultă o diminuare a intensităţii luminii ce ajunge la fotomultiplicator. Se determină extincţiile obţinute cu soluţii standard ale elementului de analizat construind astfel o curbă de etalonare a aparatului. Se introduc apoi probele de analizat prelucrate în mod corespunzător iar din compararea extincţiei citite cu cele din curba de etalonare se calculează concentraţia elementului de analizat.

Amănuntele privind modul de funcţionare sînt indicate în prospectele aparatelor.

BIBLIOGRAFIE

Elwell, W. L. T., Gidley, J. A. F., *Atomic absorption Spectrophotometry*, Ed. II, Pergamon Press, Oxford, 1966; Kekedi, L., *Analiză fizico-chimică*, Ed. did. şi ped., Bucureşti, 1969; Reynolds, R. J., Aldous, K., *Atomic Absorption Spectroscopy, A practical Guide*, Griffin, London, 1970.

Scanned with OKEN Scanner

4.1.6. | FLUORIMETRIA

Fluorescența este fenomenul emisiei de lumină sub acțiunea unei radiații absorbite, emisie care are loc atîta timp cît durează și absorbția. Cele mai utilizate surse de excitație sînt radiațiile din domeniul vizibil și ultraviolet (mai recent și razele X), radiațiile cu lungimea de undă mai mică (mai bogate în energie) fiind mai active. Prin absorbția unui foton de către o moleculă, un electron este ridicat pe un nivel de energie superior, molecula fiind într-o stare excitată. După o perioadă scurtă de timp (10^{-8}—10^{-7} secunde), caracteristică fiecărui atom sau moleculă, electronul revine pe un nivel de energie mai scăzut, tranziție însoțită de emisia unui foton. Deoarece o parte din energia absorbită este consumată în ciocniri, deci disipată ca energie termică, energia luminii fluorescente va fi mai mică decît cea a luminii incidente și lungimea de undă a radiației fluorescente este mai mare ca cea a radiației excitante (regula lui Stokes).

Din punct de vedere analitic interesează relația dintre concentrația soluției și intensitatea fluorescenței. Intensitatea radiației de fluorescență, emisă în toate direcțiile, este egală cu intensitatea radiației absorbite (dată de legea Lambert-Beer) multiplicată cu randamentul cuantic al fluorescenței (φ):

$$F = [I_0(1-10^{-\varepsilon cd})]\,[\varphi]$$

Randamentul cuantic al fluorescenței este raportul dintre numărul de cuante emise și numărul de cuante absorbite, fiind o mărime determinată experimental pentru fiecare substanță în anumite condiții (solvent, *pH*).

Dacă soluția este atît de diluată încît cantitatea de lumină absorbită este foarte mică, relația de mai sus devine:

$$F = [I_0 \cdot (2,3\ \varepsilon cd)]\,[\varphi]$$

Deci la concentrații mici, intensitatea radiației de fluorescență este direct proporțională cu concentrația. La concentrații mari această proporționalitate nu se mai menține. Dacă concentrația este foarte mare, absorbția soluției este și ea mare încît soluția se prezintă opacă pentru radiația incidentă. Astfel nu poate avea loc excitația moleculelor pentru că nu pătrunde lumina prin soluție. La concentrații ceva mai mici, cu toate că lumina incidentă trece prin soluție, stratul de soluție mai apropiat de sursă absoarbe o parte însemnată a radiației incidente, astfel că pentru restul soluției rămîne disponibilă o energie din ce în ce mai mică. De aceea fluorescența soluției este neuniformă, mai intensă în apropierea sursei, ea poate scădea la zero în restul soluției. Partea din soluție care nu prezintă fluorescență va absorbi o parte

Scanned with OKEN Scanner

din fluorescența emisă de stratul apropiat sursei. La concentrații mici fluorescența este neuniformă în întreaga soluție dar numărul moleculelor fiind scăzut, este necesară o lumină incidentă de intensitate mare pentru a excita o proporție mare de molecule. În același timp trebuie mărită sensibilitatea detectorului.

Din cele spuse mai sus reiese că fluorescența este proporțională cu concentrația atît timp cît soluția absoarbe o cantitate semnificativă din lumina excitantă (peste 5%). Fluorimetria este mult mai sensibilă decît fotometria. Fluorimetria începe la diluții prea mari pentru spectroscopia de absorbție. De asemenea fluorimetria poate fi folosită la o gamă mai largă de concentrații decît fotometria. Dacă citirile fotometrice sînt restrînse la transmisii între 5—90%, o scară de concentrații de 1 : 25, măsurătorile fluorimetrice acoperă o scară de concentrații de 1 : 1000 — 1 : 10.000.

Aparatele folosite în determinările de flourescență sînt numite în general fluorometre. Ca sursă de excitație se folosesc lămpi cu filament de wolfram, lămpi de hidrogen sau, ca surse de radiații cu intensitate mai mare, lămpi de mercur sau de xenon. Selectarea lungimii de undă a luminii excitatoare se face cu ajutorul filtrelor sau a monocromatoarelor.

Fluorometrele cu filtre sînt aparate mai simple, care folosesc filtre primare pentru radiația de excitație și filtre secundare pentru radiația de fluorescență. Ca detectoare se folosesc mai ales fotocelule cu strat de oprire.

Dispozitivele de măsurare a fluorescenței atașate spectrofotometrelor folosesc pentru excitare lampa de mercur cu filtre potrivite, iar lumina emisă este analizată prin monocromatorul și detectorul spectrofotometrului. Măsurătorile sînt limitate în general la cazurile cînd maximele de absorbție coincid cu una din liniile mercurului. Ele nu permit măsurarea spectrelor de excitație.

Aparate mai perfecționate sînt *spectrofluorometrele*, care au ca sursă de excitație lămpi de xenon, selectează radiațiile excitante și cele de fluorescență cu monocromatoare, iar ca detectoare folosesc tuburi fotomultiplicatoare. Aceste aparate permit trasarea spectrelor de excitare și a celor de fluorescență.

Măsurătorile fluorimetrice sînt afectate de foarte mulți factori. Astfel, un factor foarte important este *pH*-ul care afectează nu numai intensitatea radiației de fluorescență ci și poziția și forma benzilor în spectru. De aceea în măsurătorile de fluorescență trebuie să se lucreze în prezență de tampon. Unele substanțe împiedică producerea fluorescenței, fenomen denumit stingerea fluorescenței (quenching). De asemenea, urme de substanțe aflate în soluție pot avea efecte mari asupra fluorescenței (de pildă urme de Cl^- descresc fluorescența chininei, iar

Scanned with OKEN Scanner

alcoolul creşte fluorescenţa tiocromului). Fluorescenţa are un coeficient negativ de temperatură mare, o creştere de temperatură cu 1°C descrescînd fluorescenţa cu 1%. Datorită acestor factori care influenţează măsurătorile de fluorescenţă trebuie să se menţină condiţii identice în tot cursul determinărilor.

Determinările de fluorescenţă se fac după două tehnici: prin transparenţă şi prin difuziune. În prima variantă, sursa de lumină şi receptorul sînt aşezate pe aceeaşi direcţie. Dezavantajul este că trebuie eliminată complet partea neabsorbită a luminii excitante. În al doilea caz, sursa şi detectorul nu sînt aşezate pe aceeaşi direcţie, ci sub un unghi (de ex. 90°). În acest caz trebuie eliminat efectul Tyndall.

BIBLIOGRAFIE

Guibault, G.G. (edit.), *Fluorescence, Theory, instrumentation and Practice*, M. Deker, New York, 1967; Hercules, D. M. (editor), *Fluorescence and Phosphorescence Analysis*, Interscience, New York, 1966; Kekedy, L., *Analiză fizico-chimică*, Ed. did. şi ped., Bucureşti, 1969. Laurence, D.S.R., *Fluorescence Techniques for the Enzymologist*, in *Methods in Enzymology*, edit. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, vol. IV, 1957; Udenfriend, S., *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, New-York—London, Academic Press, 1964 (vol. I) şi 1970 (vol. II).

4.2. | Metodele cromatografice

Cromatografia permite separarea substanţelor dintr-un amestec pe baza capacităţii de distribuţie între o fază staţionară şi una mobilă, avînd ca urmare deplasarea cu viteză diferită a componentelor purtate de faza mobilă de-a lungul fazei staţionare. Există şi posibilitatea determinării cantitative a componentelor separate.

Metodele cromatografice se pot clasifica după starea de agregare a fazei staţionare şi mobile şi după fenomenul de absorbţie sau de repartiţie între două faze nemiscibile în: cromatografie pe hîrtie, cromatografie în strat subţire, cromatografie pe coloană în fază lichidă şi cromatografie în fază gazoasă.

4.2.1. | CROMATOGRAFIA PE HÎRTIE

În cromatografia pe hîrtie are loc o repartiţie a substanţelor ce se separă între stratul de lichid polar (apă) aderent de hîrtie şi faza mobilă organică, nemiscibilă cu apa. Deci este o cromatografie de repartiţie de tip lichid-lichid (L—L).

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica este simplă şi cuprinde mai multe operaţii:

a) Aplicarea probei: din substanţa de analizat, aflată sub formă de soluţie, se aplică o cantitate mică la 2—3 *cm* de unul din capetele hîrtiei (linia de start). b) Uscarea spotului. c) Developarea: se face prin cufundarea hîrtiei în lichidul developant. Prin capilarele hîrtiei, lichidul se deplasează spre capătul hîrtiei opus liniei de start pînă la o linie numită frontul solventului. Developarea trebuie să se facă într-o atmosferă închisă, saturată cu vaporii developantului. d) Uscarea cromatogramei, evidenţierea spoturilor componentelor separate, identificarea lor. f) Determinarea cantitativă a substanţelor separate, prin densitometrie sau prin decuparea spoturilor şi eluarea componentelor de pe hîrtie.

Componentele se identifică prin comparare cu soluţii standard care conţin amestecuri cu compoziţie cunoscută. Identificarea componentelor se poate face şi pe baza *factorului de retenţie*, numit Rf, cu valori între 0 şi 1.

$$Rf = \frac{\text{viteza substanţei}}{\text{viteza developantului}} = \frac{\text{distanţa parcursă de substanţă}}{\text{distanţa parcursă de developant}}$$

Măsurarea distanţei se face în *mm* sau *cm;* dacă petele sînt simetrice se măsoară distanţa pînă la centrul petei. Dacă distribuţia în interiorul petei este asimetrică se consideră punctul de concentraţie maximă, care poate diferi de centrul geometric al petei.

Materiale necesare

Ca suport se utilizează hîrtie cromatografică: Whatman, Schleicher-Schüll etc., cu porozitate diferită. Există şi hîrtie din fibre de sticlă sau tratată în mod special încît funcţionează şi ca schimbător de ioni.

Pentru aplicare se pot folosi micropipete, pipete Pasteur, sau aparate speciale care permit întinderea lineară a spotului şi asigură uscarea rapidă. La acestea hîrtia vine în contact cu o sticlă încălzită de un bec subiacent.

Developarea se poate face în aparate speciale de sticlă de diferite forme şi dimensiuni (fig. 12). În general aparatele sînt voluminoase fiindcă pentru o separare bună pe hîrtie sînt necesare distanţe mari pe care trebuie să le parcurgă developantul.

În lipsa unor aparate speciale se poate confecţiona un dispozitiv simplu din două vase cilindrice de acelaşi diametru puse cap la cap şi lipite la locul de contact cu bandă de lipit. În centrul cilindrului inferior se introduce un cristalizor mic în care se pune soluţia ce asigură umiditatea atmosferei din cameră iar în jur se toarnă develo-

Scanned with OKEN Scanner

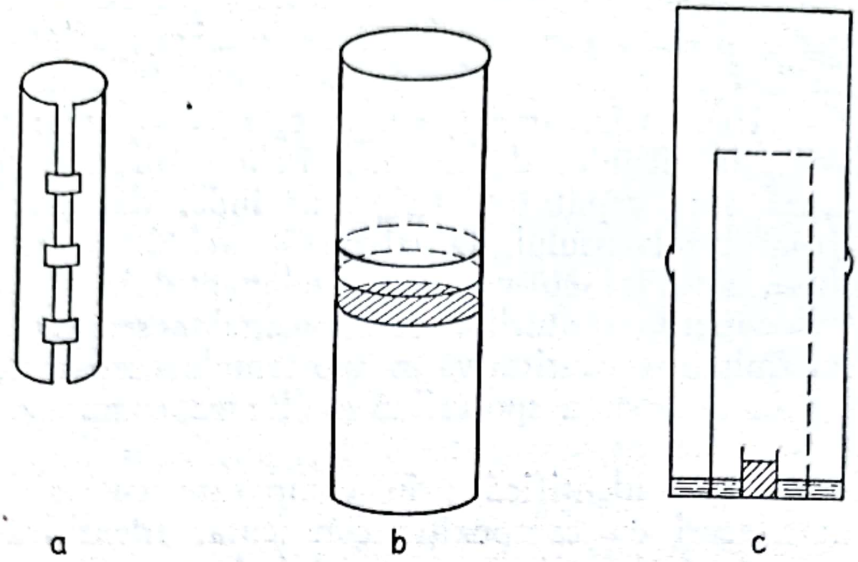


Fig. 12. Dispozitiv simplu pentru cromatografia pe hîrtie: a) hîrtia de filtru răsucită sub formă de cilindru; b) camera cromatografică alcătuită din două vase cilindrice lipite cap la cap; c) dispozitivul de cromatografiere conţinînd hîrtia imersată în developant.

pantul. Hîrtia cromatografică (30×30 *cm* sau 25×25 *cm*) se răsuceşte sub forma unui cilindru şi se leagă marginile cu aţă albă, introducînd-o în developant (fig. 12).

Developarea se poate face ascendent, iar în cazul aparatelor speciale, prevăzute cu mai multe cuve, se poate face şi descendent sau circular.

În laboratoarele clinice cromatografia pe hîrtie se foloseşte la separarea aminoacizilor, glucidelor, unor hormoni sau metaboliţi ai lor. Amănunte privind cromatografia în aceste cazuri sînt date la descrierea metodelor respective.

BIBLIOGRAFIE

Block, R. J., Durrum E. L., Zweig, G., *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Acad. Press, New York, 1955; Cramer, F., *Paper Chromatography*, Macmillan, London, 1954; Hais, I. M., Macek, K., *Cromatografia pe hîrtie*, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1960.

4.2.2. | CROMATOGRAFIA ÎN STRAT SUBŢIRE

Deşi a intrat mai tîrziu în practica laboratorului decît cromatografia pe coloană şi cea pe hîrtie, a cunoscut o dezvoltare rapidă după 1955—1960.

Tehnica se bazează pe obținerea unui strat de adsorbant (silicagel, oxid de aluminiu, celuloză cristalină) de cca. 250 μm pe plăci de sticlă, de diferite dimensiuni. Se aplică o cantitate mică din probă în mod similar ca la cromatografia pe hîrtie, la 1,5 *cm* de unul din capetele plăcii. Se introduce placa într-un vas închis etanș, în care s-a realizat în prealabil o atmosferă saturată cu vaporii developantului și se imersează placa în developant, astfel ca spotul aplicat să fie la cca. 1 *cm* deasupra nivelului lichidului. Developantul migrează printre particulele de absorbant, ce constituie faza staționară, și se produce separarea componentelor ca în orice metodă cromatografică. Cînd solventul ajunge la cca. 1,5—2 *cm* de capătul plăcii, se scoate placa din vas și se usucă. Se vizualizează spoturile prin examinare în lumină ultravioletă (după pulverizare cu fluoresceină, rodamină etc.), sau prin reacții de culoare specifice (de ex. iodul pentru lipide, ninhidrină pentru aminoacizi).

Apoi urmează identificarea componentelor separate, pe baza Rf și prin comparare cu substanțe etalon. Determinarea cantitativă se poate face densitometric prin eluarea componentelor de pe adsorbant. Ca adsorbanți se utilizează: silicagelul (cel mai folosit), oxidul de aluminiu, kieselgurul, hidroxidul de aluminiu, pulberea de celuloză, poliamidele, sephadex-ul, rășini schimbătoare de ioni. Pentru întindere pe plăci se face o suspensie în apă în anumită proporție a adsorbantului, care se întinde rapid pe placă cu ajutorul unor aparate speciale sau manual. Se lasă să se usuce în poziție orizontală. Înainte de utilizare placa se activează la etuvă, cel puțin o oră la 110°C.

În fiecare metodă se indică amestecul developant. Pentru reproductibilitatea rezultatelor trebuie să se țină cont de calitatea adsorbantului, gradul de activare și umiditatea în timpul aplicării probelor și a developării, grosimea stratului adsorbant, calitatea developanților (solvenți foarte puri), saturarea atmosferei din vasul cromatografic, cantitatea de substanță aplicată, temperatura și prezența impurităților.

Aparatura necesară este foarte simplă: plăci de sticlă de diferite dimensiuni (5×10 *cm* pînă la 20×20 *cm*), vase cilindrice sau paralelipipedice prevăzute cu capac, utilizate drept cuvă cromatografică, micropipete, un pulverizator pentru reactivii de identificare și un dispozitiv pentru întinderea adsorbantului pe plăci.

În cadrul laboratorului de cromatografie al Catedrei de chimie analitică a Facultății de Chimie-Cluj, s-au realizat o serie de dispozitive și materiale cromatografice dintre care amintim: cameră N-cromatografică, cameră S-cromatografică, cameră S-cromatografică pentru developare continuă, cameră S-cromatografică cu gradient ortogonal de temperatură, aparat de întins straturi subțiri, precum și alte dispozitive anexe. Ca materiale cromatografice s-au realizat: plăci cromatogra-

Scanned with OKEN Scanner

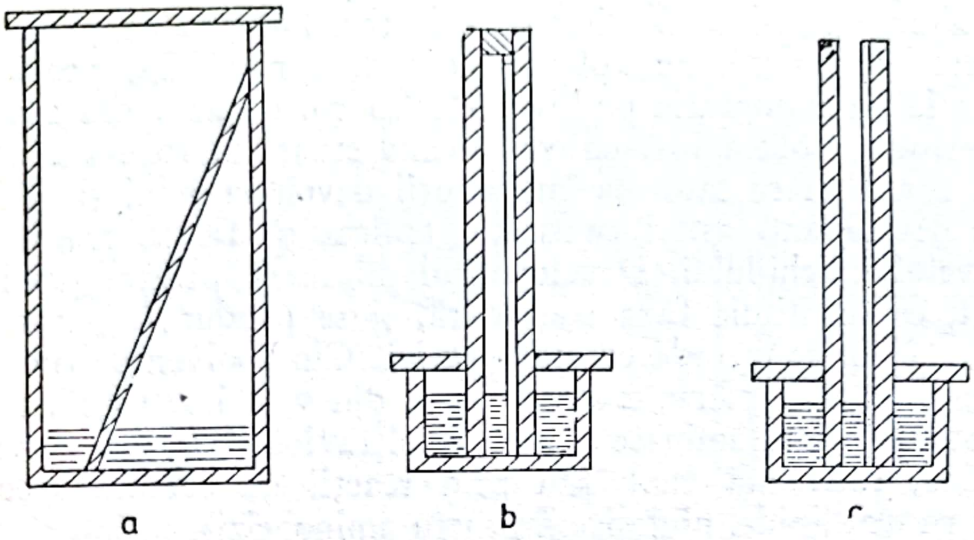


Fig. 13. Diferite tipuri de camere cromatografice: a) cameră N-cromatografică; b) cameră S-cromatografică; c) cameră S-cromatografică continuă.

fice cu silicagel R, silicagel RG (cu 13% gips) pentru strat subţire şi silicagel RC pentru coloană. Toate aceste materiale sînt produse în serie mică de către Centrul de Cercetări de chimie analitică Cluj.

BIBLIOGRAFIE

Kirchner, J. G., *Thin-Layer Chromatography*, in *Technique of Organic Chemistry*, vol. XII, Ed. Weissberger A., Interscience, New York, 1967; Stahl, E., *Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch*, ed. II, Springer-Verlag, Berlin, 1967; Randerath K., *Dünnschicht-Chromatographie*, ed. II, Verlag-Chemie, Weinheim-Bergstr, 1965; Pelloni-Tamaş, V., Iohan, F., *Cromatografia în strat subţire*, Ed. tehnică, Bucureşti, 1971.

5. NOŢIUNI GENERALE DE ANALIZĂ ENZIMATICĂ

Diagnosticul enzimatic, una dintre achiziţiile recente ale chimiei clinice, necesită cunoaşterea biochimiei şi a cineticii enzimatice. În acest capitol ne limităm la cîteva principii ce trebuiesc cunoscute pentru a se putea efectua o determinare corectă de activitate enzimatică.

Prin *analiză enzimatică* înţelegem determinarea activităţii enzimelor în lichidele biologice şi organe, ca şi alte determinări de substanţe în care se utilizează enzime (2).

5.1. Factori care influenţează determinarea activităţii enzimelor

Enzimele sînt proteine puţin stabile, care pot suferi o inactivare reversibilă sau o denaturare ireversibilă. De aceea determinarea enzimelor trebuie făcută cît mai rapid posibil. Enzimele sînt foarte sensibile la metale grele, săpunuri, detergenţi, acizi. Ca urmare, sticlăria utilizată, inclusiv recipientele în care se recoltează probele biologice, trebuie să fie foarte curată pentru a se înlătura erorile. Pipetele, eprubetele etc., trebuie spălate cu detergenţi, clătite cu apă de robinet şi apoi cu apă distilată. Sticlăria trebuie uscată la etuvă la o temperatură sub 120°C, folosirea alcoolului, acetonei şi a eterului pentru spălare trebuie înlăturată. La prepararea soluţiilor se va folosi apa bidistilată în aparate de sticlă.

Enzimele se diferenţiază de alte proteine prin proprietăţile lor catalitice, adică prin capacitatea de a accelera (de mii sau milioane de ori) reacţiile chimice termodinamice posibile ($\Delta G < 0$). În mod simplificat se poate reprezenta o reacţie enzimatică în felul următor:

$$S + E \underset{k_1}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} SE \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (5.1)$$

unde S reprezintă substratul, P produsul de reacţie, E enzima (care deşi participă la reacţie în final se regăseşte nemodificată), iar ES complexul enzimă-substrat. Constanta k este constanta de viteză a reacţiei, caracteristică pentru fiecare enzimă.

În principiu toate reacţiile enzimatice sînt reversibile dar condiţiile de determinare (pH, concentraţia substratului etc.) se aleg în aşa fel încît echilibrul să se deplaseze complet într-un sens. Prin definiţie reacţia se desfăşoară lent în mod spontan:

$$S \rightarrow P$$

de aceea în determinările enzimatice se recurge întotdeauna la un martor („blanc") corespunzător. Aceasta este o probă paralelă în care nu se adaugă enzime sau se adaugă un agent care inhibă sau distruge enzima.

Trebuie făcută distincţia între concentraţia enzimei şi activitatea enzimei. *Concentraţia enzimei* reprezintă numărul de molecule de enzimă (cantitatea enzimei exprimată în g sau *mg*) pe unitate de material biologic (g sau litru). Determinarea concentraţiei enzimei este dificil de realizat: enzima trebuie izolată şi apoi dozată prin reacţii chimice sau imunologice (seruri antienzime). Ceruloplasmina este o excepţie

Scanned with OKEN Scanner

fiindcă se poate determina relativ simplu prin metode chimice, imunologice şi catalitice.

Din punct de vedere biologic efectul catalitic este mai important decît concentraţia şi mai uşor de determinat. La determinarea *activităţii enzimei* un număr limitat de molecule de enzimă acţionează asupra unui exces de molecule de substrat în condiţii definite şi un anumit timp (durata de incubare). Cantitatea de substrat transformată în unitatea de timp serveşte ca măsură pentru activitate. Se măsoară fie scăderea concentraţiei substratului ($-dS/dt$) fie creşterea concentraţiei produsului ($+ dP/dt$):

$$\text{activitatea enzimei} = -\, dS/dt = +\, dP/dt \qquad (5.2.)$$

La determinarea activităţii unei enzime se admite implicit că activitatea şi concentraţia enzimei sînt direct proporţionale:

$$-\, dS/dt = [E] \cdot k$$

Din punct de vedere cinetic reacţia catalizată este de ordinul zero pentru majoritatea enzimelor importante din punct de vedere diagnostic (excepţie face tripsina). Aceasta înseamnă că viteza reacţiei, adică transformarea substratului în unitate de timp (dS/dt), este constantă în cursul incubării. Deci pentru o concentraţie constantă a enzimei există o proporţionalitate între substratul transformat şi timp (fig. 15).

Dublînd cantitatea de enzimă sau durata de incubare, menţinînd celelalte condiţii identice, se obţine o cantitate dublă de produs de reacţie. Trebuie menţionat că aceste relaţii sînt adevărate atîta timp cît nu apar modificări ale enzimei. În practică, la 37°, după un timp variabil, apare denaturarea enzimei, deci cantitatea de produs nu mai este proporţională cu timpul. Denaturarea se produce cu atît mai repede cu cît enzima este mai diluată. Prin urmare practic trebuie încercată determinarea cu cantitatea de produs biologic şi timpul de incubare la care se păstrează proporţionalitatea din fig. 14 şi a curbei 1 din fig. 15.

Dacă în tehnicile vechi *durata de incubare* atinge 12 sau 24 ore, actualmente un timp aşa de lung de incubare nu se mai admite decît excepţional (ornitin-carbamil-transferaza). Timpul de incubare trebuie să fie cît mai scurt posibil, să nu depăşească de regulă 1 oră. La timpuri lungi de incubare poate să apară şi contaminarea cu bacterii.

Determinarea activităţii enzimelor trebuie să se facă în condiţii optime, adică în aşa fel încît să se obţină activitatea maximă posibilă. Condiţiile optime se referă la alegerea substratului, concentraţia substratului, temperatură, *pH*, surse de enzimă.

Scanned with OKEN Scanner

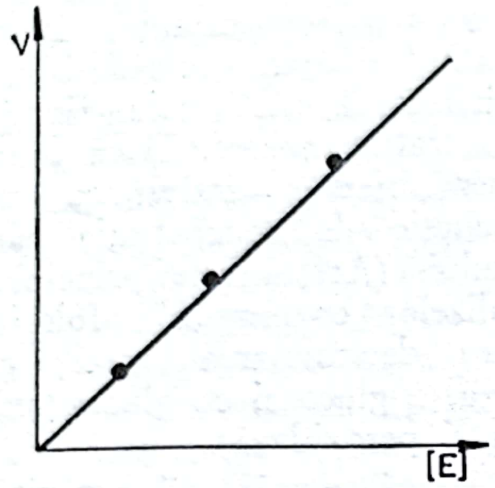


Fig. 14. Relaţia dintre concentraţia enzimei (pe abscisă) şi viteza reacţiei catalizată enzimatic (pe ordonată).

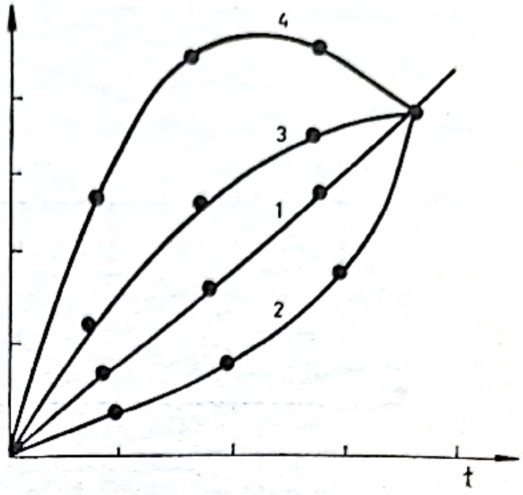


Fig. 15. Variaţia în timp a cantităţii de substrat transformată sub acţiunea enzimei. Pe abscisă timpul de incubare; pe ordonată cantitatea de substrat transformat: 1) Cantitatea substratului transformat este proporţională cu timpul. 2) Variaţia substratului transformat în cazul unor fenomene autocatalitice (enzima se activează în cursul incubării) 3, 4 diminuarea transformării substratului ca urmare a scăderii substratului sau prin apariţia unor inhibitori.

Alegerea substratului este determinată de specificitatea pentru substrat a enzimei. Astfel, pentru majoritatea enzimelor care se dozează prin testul optic (NAD), specificitatea de substrat este foarte mare, în aşa fel încît nu se pot utiliza alte substrate (de exemplu transaminazele şi lactat-dehidrogenaza).

Pentru alte enzime activitatea se poate determina cu mai multe substrate. De exemplu fosfataza alcalină scindează betaglicero-fosfatul, fenil-fosfatul, glucozo-6-fosfatul, p-nitrofenil-fosfatul şi alfa-naftil-fosfatul. Deoarece pentru fosfataza alcalină nu se cunoaşte substratul „natural", fiziologic, se poate folosi oricare dintre substratele menţionate cu condiţia ca rezultatele să fie reproductibile şi determinarea cît mai simplă din punct de vedere tehnic.

O situaţie asemănătoare se întîlneşte în cazul peptidazelor. Activitatea tripsinei se poate determina cu edestină, gelatină, cazeină sau hemoglobină. Datele actuale arată că peptidazele scindează specific legăturile dintre anumiţi aminoacizi. De aceea în prezent se încearcă înlocuirea substratelor nespecifice ale peptidazelor (protide cu greutate moleculară mare), cu peptide bine definite. Reproductibilitatea rezultatelor şi specificitatea metodelor sînt astfel mult îmbunătăţite.

Scanned with OKEN Scanner

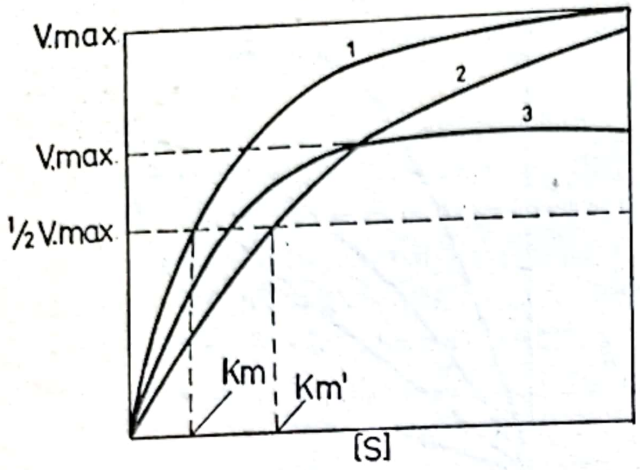


Fig. 16. Reprezentarea grafică a vitezei reacţiilor enzimatice (pe ordonată) în funcţie de concentraţia substratului după ecuaţia Michaelis-Menten (pe abscisă). Curba 1 — enzimă; curba 2 — enzimă + inhibitor competitiv; curba 3 — enzimă + inhibitor necompetitiv; Km, constanta Michaelis în lipsa de inhibitor; Km', constanta Michaelis în prezenţa unui inhibitor competitiv.

Concentraţia substratului are o mare importanţă. Dacă substratul este în exces activitatea măsurată este în funcţie de concentraţia enzimei. Dacă enzima este în exces activitatea este în funcţie de concentraţia substratului. (Acesta este principiul „analizelor enzimatice" folosite pentru determinarea ureei cu urează, a glucozei cu glucozooxidază şi peroxidază).

Dacă se măsoară activitatea unei cantităţi constante de enzimă în funcţie de concentraţia de substrat se obţine curba din fig. 16. Rezultă că viteza este constantă numai la concentraţii mari de substrat la care se obţine viteza maximă (V_{max}). Concentraţia substratului la care viteza reacţiei este jumătate din viteza maximă ($V_{max}/2$) se numeşte *constanta lui Michaelis* (K_m). Cunoaşterea K_m este importantă practic. În determinările din laboratorul clinic se alege concentraţia substratului de 10 ori mai mare decît K_m, atingînd astfel 90% din V_{max}. Cu cît K_m este mai mic, cu atît afinitatea enzimei pentru substrat este mai mare. K_m are valori între $1 - 10^{-8}$ M.

O reacţie enzimatică este caracterizată cantitativ dacă se cunoaşte V_{max} şi K_m. Ele sînt legate prin ecuaţia lui Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m}. \qquad (5.3)$$

În practică, la determinarea V_{max} şi K se utilizează o altă formă a ecuaţiei numită linearizarea Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right)\left(\frac{1}{S}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right) \qquad (5.4)$$

Se determină viteza de reacţie la diferite concentraţii de substrat, mai mic şi mai mari decît valoarea K_m, se reprezintă grafic $1/V$ în funcţie de $1/S$, apoi se calculează V_{max} şi K_m din intersecţia dreptei cu axele de coordonate.

Definirea lui V_{max} şi K_m are avantajul de a preciza modul de acţiune a *inhibitorilor*, substanţe care inhibă activitatea catalitică a enzime-

Scanned with OKEN Scanner

lor prin două mecanisme: competitiv şi necompetitiv. *Inhibitorul competitiv* intră în competiţie cu substratul pentru centrul activ al enzimei, deci inhibiţia este înlăturată la concentraţii mari de substrat (K_m creşte, V_{max} este acelaşi). *Inhibitorul necompetitiv* scade activitatea enzimei prin combinarea într-un alt loc de fixare decît cel al substratului (prin urmare K_m este acelaşi dar scade V_{max}) (fig. 16 şi 17)

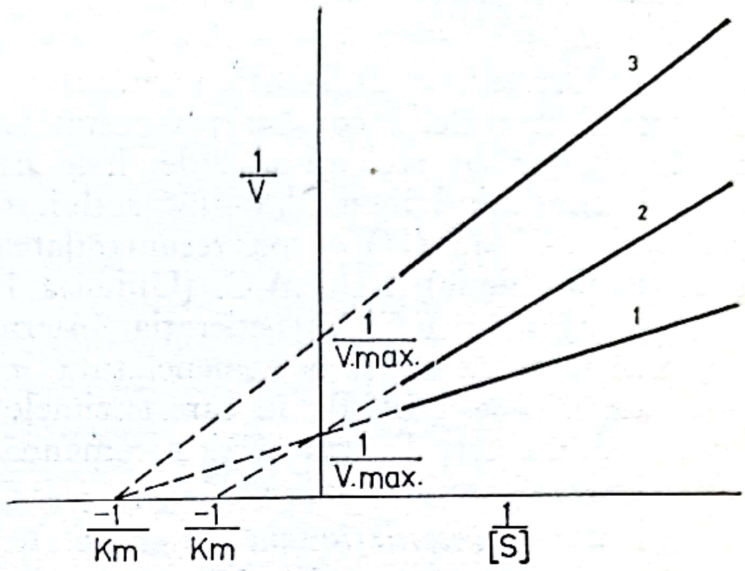


Fig. 17. Reprezentarea Lineweaver-Burk, ilustrînd efectul inhibitorilor. Pe abscisă valoarea reciprocă a concentraţiei substratului $\frac{1}{S}$; pe ordonată valoarea reciprocă a vitezei reacţiei enzimatice 1/v, dreapta 1 — enzima; dreapta 2 — enzima + inhibitor competitiv; dreapta 3 — enzima + inhibitor necompetitiv.

Temperatura influenţează activitatea enzimatică în aşa fel încît pentru o creştere a temperaturii cu 10°C activitatea se dublează. Dar odată cu creşterea temperaturii este accelerată inactivarea şi denaturarea enzimei, în special pentru cazul unei durate lungi de incubare. De aceea pentru majoritatea enzimelor temperatura ideală de măsurare este de 25°C—30°C şi nu de 37°C. Practic se lucrează la o temperatură mai mare doar atunci cînd sîntem obligaţi să creştem sensibilitatea metodei avînd o cantitate mică de enzimă.

Pentru majoritatea enzimelor există un *pH optim*, care este influenţat de prezenţa activatorilor şi a inhibitorilor. În practică este indicat să se renunţe la tampoanele de fosfaţi, care influenţează activitatea enzimelor şi în plus reprezintă un mediu de cultură pentru bacterii şi ciuperci. Se recomandă tampoanele aminate: colidină, tris, trietanolamină (vezi la anexă).

Sursa de enzimă, *ser sau plasmă*, prezintă importanţă doar în cazul enzimelor care sînt eliberate din trombocite în cursul coagulării (de exemplu o treime din fosfataza acidă din ser provine din trombocite). Pentru majoritatea enzimelor determinate în laboratorul clinic nu are importanţă dacă se lucrează pe ser (fără hemoliză) sau pe plasmă. Richterich (1) recomandă să se lucreze întotdeauna pe plasmă fiindcă în acest caz pericolul hemolizei este mai mic (eritrocitele sînt foarte bogate în enzime). În unele cazuri (piruvat-kinaza, glutamico-piruvico-transaminaza) hemoliza nu modifică rezultatul.

Scanned with OKEN Scanner

5.2. | Unităţi enzimatice

În prezent se utilizează numeroase sisteme de unităţi enzimatice. Aceasta face dificilă compararea rezultatelor obţinute în diferite laboratoare, chiar cu aceleaşi metode. Este necesar să se renunţe la aceste unităţi, exprimînd în mod unitar activitatea enzimelor în *unităţi internaţionale* (*U* sau *UI*), după recomandarea I.U.B. (Uniunea Internaţională de Biochimie), I.U.P.A.C. (Uniunea Internaţională de Chimie Pură şi Aplicată) şi I.F.C.C. (Federaţia Internaţională de Chimie Clinică). De asemenea, există şi o nomenclatură internaţională, stabilită de Comisia de enzime a I.U.B., în care enzimele sînt notate cu cifre. Pe lîngă nomenclatura actuală uzuală se recomandă a se preciza şi enzima după această clasificare internaţională.

Unitatea internaţională de activitate enzimatică este cantitatea de enzimă care transformă 1 *μmol* substrat/minut, la 25°C, în condiţii optime (concentraţia substratului, forţa ionică a tamponului, *pH* optim).

$$1\ UI\ (\text{sau}\ U) = 1\mu mol\ \ (\text{substrat})/\text{min}.$$

În mod convenţional se apreciază concentraţia enzimei prin raportul:

$$\text{„concentraţia enzimei''} = \frac{\text{unitatea de activitate}}{\text{unitate de probă}}$$

În determinările pe lichide biologice (ser, urină etc.) se ia ca referinţă 1000 *ml*. Deci, activitatea enzimelor se exprimă în *UI*/litru, sau mai frecvent în *mU/ml* (25°C), valorile numerice fiind identice.

Pentru convertirea unităţilor enzimatice folosite de diferiţi autori în unităţi internaţionale se poate utiliza tabelul de mai jos:

TABEL NR. 3

FACTORI DE CORECŢIE PENTRU CONVERSIA UNOR UNITĂŢI ENZIMATICE ÎN UNITĂŢI INTERNAŢIONALE

Unităţi folosite la determinarea unor enzime.	*Pentru conversie în mU/ml se multiplică cu :*
1. Reacţii NAD/NADP-dependente	
Bücher şi col. 25°C, 1 *ml*, 100 sec.; $\Delta E_{366} = 0{,}100$	18,2
Wroblewski şi col. 23°C, 3 *ml*, 1 min.; $\Delta E_{340} = 0{,}001$	0,483

Scanned with OKEN Scanner

(continuare Tabelul 3)

Unităţi folosite la determinarea unor enzime.	*Pentu conversie în mU/ml se multiplică cu:*
Amelung şi Horn 25 °C, 1 $\mu mol/h \times ml$	16,7
Holzer şi Gerlach 24 °C, 3 *ml*, 1 min.; $\Delta E_{366} = 0{,}001$	0,91
2. Aldolaza Bruns 37 °C, 1 μl fructozo-1,6-difosfat/h $\times$ *ml*	0,61 (la 37 °C)
Schapira şi col. 37 °C, 1 *mg* triozofosfat/1 min. $\times$ 1000 *ml*	16 (la 37 °C)
3. Fosfataza alcalină King-Armstrong 37 °C, 1 *mg* fenol/15 min. $\times$ 100 *ml*	7,1 (la 37 °C)
Bessey-Lowry (şi pentru fosfatază acidă) 37 °C, 1 *mmol* p-nitrofenol/h $\times$ 1000 *ml*	16,7(la 37 °C)
Bodansky (de asemenea pentru fosfatază acidă) 37 °C, 1 *mg* P/h $\times$ 100 *ml*	5,4 (la 37 °C)
4. Fosfatază acidă King-Armstrong 37 °C, 1 *mg* fenol/h $\times$ 100 *ml*	1,8 (la 37 °C)
5. Amilaza Somogyi 37 °C, 5 *mg* amidon/15 min. $\times$ 100 *ml*	20,6 (la 37 °C)
Wohlgemuth 38 °C, 1 *mg* amidon în 30 min.	

Şi în cazul utilizării unităţilor internaţionale în literatură apar valori diferite pentru limitele normale datorită varietăţii metodelor folosite în determinări.

În *analizele pe ţesuturi,* activitatea enzimatică trebuie raportată la masa activă a celulei. Există mai multe posibilităţi:

Baze de referinţă	*Observaţii*
Greutate umedă	Depinde de hidratarea ţesutului.
Greutate uscată	Depinde de conţinutul în lipide şi glucide.
Greutate uscată fără grăsimi	Depinde de glucide şi de ţesut conjunctiv
Azotul	Depinde de azotul neproteic
Azotul proteic	Interferează proteinele inerte din punct de vedere metabolic.
Proteine necolagene	Influenţate de heterogenitate (de exemplu infiltraţii cu leucocite)

Scanned with OKEN Scanner

Baza de referință	*Observații*
Celula	Metodă exactă, dar inaplicabilă în toate cazurile.
ADN celular	Neutilizabilă în poliploide.

În lucrările *analitice și cinetice* se exprimă *activitatea enzimatică specifică*. În cazul ideal aceasta corespunde numărului de molecule de substrat transformate pe minut, pe centru activ al unei molecule de enzimă. Dar cum nu se cunoaște nici greutatea moleculară nici numărul centrilor activi, se poate utiliza una din aproximațiile următoare:

Exprimarea activității specifice	*Observații*
X (substrat) · min^{-1}/g proteină	Unitate arbitrară (X corespunde la o mărime de măsurat: extincție scădere *pH* etc.)
$-Q$ (substrat) · h^{-1}/g proteină	Unitate manometrică, $-Q$ în μl sau în $\mu moli$ (1 μmol O_2 = = 22,4 μml),
$\mu moli$ (substrat) · min^{-1}/g proteină	Unitate practică
moli (substrat) · min^{-1}/mol de enzimă	Constanta catalitică
moli (substrat) · min^{-1}/centru activ	Număr de transformare, de turnover

5.3. Determinarea practică a activității enzimatice

5.3.1. DETERMINAREA ÎN DOUĂ PUNCTE (TIMP FIX DE INCUBARE)

Metodele în două puncte utilizează: un martor (cu enzima inactivată) și o probă cu enzimă activă. După un timp fix de incubare se inactivează și enzima din probă și activitatea se apreciază din diferența dintre probă și martor în concentrația substratului sau a produsului de reacție.

Acest mod de analiză prezintă inconvenientul că nu permite observarea cineticii de transformare a substratului. La sfîrșitul incubării (timpul t) putem obține aceleași rezultate deși viteza inițială este diferită (fig. 15). Aceasta se poate datora unor fenomene autocatalitice (în cazul tripsinei), sau cel mai adeseori diminuării activității enzimatice prin scăderea cantității de substrat sau inhibiției prin produșii finali de reacție.

Pentru eliminarea acestor artefacte se recomandă ca în toate cazurile patologice să se repete determinarea luînd jumătate din cantitatea de enzimă și un timp de incubare pe jumătate.

Scanned with OKEN Scanner

În analiza cinetică ce urmăreşte mersul reacţiei fără întrerupere, vizual sau cu aparate înregistratoare. Orice abatere de la mersul ideal (curba 1. fig. 15) se poate astfel sesiza. În plus, determinările cinetice sînt mai simple şi mai rapide. Costul reactivilor nu constituie un impediment dacă se lucrează la scară micro.

Dintre metodele cinetice foarte utilizat este *„testul optic"*, introdus de Warburg şi Christian, în 1936, pentru determinarea enzimelor transportoare de hidrogen. În principiu, se măsoară oxidarea $NADH_2$ (după denumirea veche $DPNH_2$) sau reducerea NAD(DPN):

$$XH_2 + NAD \leftrightarrow X + NADH_2$$

Se poate urmări direct oxidarea sau reducerea pe baza faptului că $NADH_2$ absoarbe puternic în regiunea 300—370 *nm*, pe cînd NAD absoarbe foarte puţin (fig. 18). De obicei se lucrează la 340 *nm* sau 366 *nm*.

Acelaşi principiu se utilizează şi pentru $NADPH_2$($TPNH_2$), respectiv NADP (TPN). Astfel prin „testele optice" se înţelege determinarea în ultraviolet a enzimelor NAD şi NADP-dependente. Există trei variante de folosire a testului optic şi prin acestea există posibilitatea dozării aproape a tuturor enzimelor în laboratorul clinic.

a. Testul optic simplu

Dacă enzima pe care o determinăm necesită NAD sau $NADH_2$ se pune în cuvă serul (enzima) dizolvat, tamponul adecvat, substratul

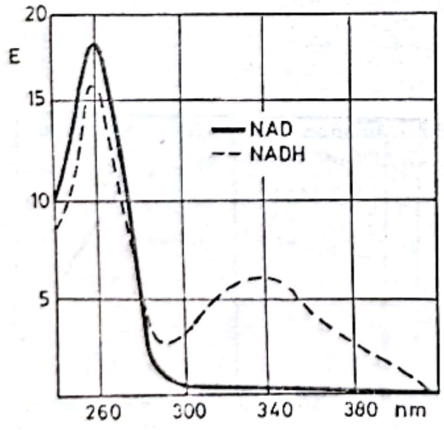


Fig. 18. Spectrele de absorbţie ale NAD şi NADH. Pe abscisă lungimea de undă (λ) în *nm*; pe ordonată extincţia.

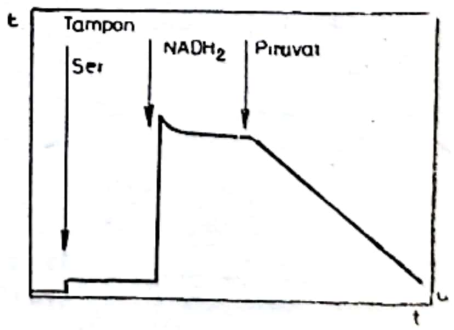


Fig. 19. Determinarea lactat-dehidrogenazei (test optic simplu). Pe abscisă timpul în minute, pe ordonată extincţia. Din momentul adăugării substratului (piruvat) reacţia enzimatică se declanşează înregistrîndu-se scăderea extincţiei pe măsură ce NADH + H se transformă în NAD.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

și $NADH_2$ și se urmărește modificarea extincției. Astfel este determinarea lactat-dehidrogenazei (fig. 19) după reacția:

$$\text{piruvat} + NADH_2 \rightarrow \text{lactat} + NAD$$

Se incubează serul, tamponul și $NADH_2$ la *pH* 7,5, pînă ce se stabilizează extincția, apoi se declanșează reacția prin adăugarea piruvatului. Scăderea extincției este proporțională cu activitatea enzimei.

Pe această cale se pot doza: sorbitol-dehidrogenaza, glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza, izocitrat-dehidrogenaza și glutamat-dehidrogenaza. În cazul testului optic simplu sînt valabile considerațiile cinetice din capitolul I.

b. Testul optic cuplat cu o reacție indicatoare

În cazul enzimelor care nu reacționează direct cu NAD, se poate cupla o reacție indicatoare. Produsul format prin acțiunea enzimei a cărei activitate dorim să o determinăm este dozat printr-o altă enzimă și NAD. De exemplu, la determinarea glutamico-piruvico-transaminazei se folosește reacția:

$$\text{L-alanină} + \text{alfa cetoglutarat} \rightarrow \text{L-glutamat} + \text{piruvat}$$

Piruvatul este apoi determinat prin reacția de la punctul a. Fiecare mol de piruvat format din alanină oxidează un mol de $NADH_2$ în NAD și este redus în lactat. Deci scăderea extincției pe minut este direct proporțională cu viteza reacției de transaminare (fig. 20). La fel se poate determina glutamico-oxalacetico-transaminaza, aldolaza sau piruvat-kinaza.

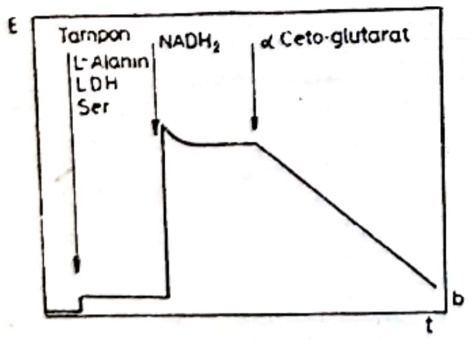


Fig. 20. Determinarea transaminazei glutamico-piruvică (aspartat aminotransferaza) cu ajutorul unui test optic cuplat cu o reacție indicatoare (vezi explicația în text).

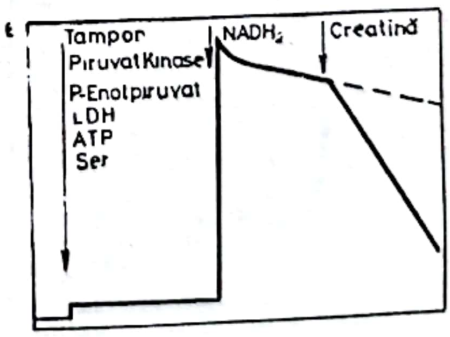


Fig. 21. Determinarea creatin-kinazei (test optic cuplat cu o reacție auxiliară și o reacție indicatoare). Linia plină, proba conținînd ser; linia punctată, martorul conținînd toți reactivii cu excepția serului.

c. Testul optic cuplat cu o reacţie auxiliară şi o reacţie indicatoare.

Dacă produsul rezultat din prima reacţie nu poate fi decelat direct printr-o reacţie indicatoare, se poate intercala un alt sistem enzimatic, sistemul auxiliar. De exemplu în cazul determinării creatin-kinazei se cuplează reacţia de măsurat cu sistemul piruvat-kinazei (reacţia auxiliară) şi cu lactat-dehidrogenază (ca reacţie indicatoare).

$$\text{creatină} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{creatin kinază}} \text{creatin} - \text{fosfat} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{fosfoenolpiruvat} \xrightarrow{\text{piruvat kinază}} \text{piruvat} + \text{ATP}$$

$$\text{piruvat} + \text{NADH}_2 \xrightarrow{\text{lactat dehidrogenază}} \text{lactat} + \text{NAD}$$

În acest caz densitatea optică nu se stabilizează după adausul $NADH_2$, datorită scindării fosfoenolpiruvatului de către fosfataza alcalină. Activitatea creatin kinazei corespunde diferenţei dintre modificarea extincţiei probei şi a martorului (fără ser) (fig. 21).

Pentru a avea o proporţionalitate directă între viteza de dispariţie a creatinei şi formarea NAD, plecînd de la $NADH_2$, trebuie să avem în exces următoarele substanţe: ATP, creatina, piruvat kinaza, fosfoenolpiruvatul, lactat dehidrogenaza şi $NADH_2$.

În ceea ce priveşte cinetica reacţiilor cuplate avem enzime care acţionează una după alta:

$$S \xrightarrow{k_1} P_1 \xrightarrow{k_2} P_2$$

unde k_1 este constanta de viteză a reacţiei de măsurat, iar k_2 a reacţiei indicatoare. Raportul k_1/k_2 este important pentru ca rezultatul să corespundă în mod efectiv activităţii sistemului. În acest scop activitatea sistemului indicator trebuie să fie mult mai mare decît a celui de măsurat, adică toţi componenţii săi trebuie să fie în exces. S-a calculat (2) că pentru excesul sistemului indicator de 100 ori rezultatul indică 96% din activitatea efectivă a sistemului de măsurat, iar pentru exces de 1000 ori, 99,3% din activitate. Practic, în cazul folosirii unei reacţii indicatoare sistemul cuplat trebuie să aibă o activitate de 100 ori mai mare, iar în cazul cuplării şi a unei reacţii auxiliare sistemul indicator trebuie să aibă o activitate de 1000 ori mai mare. Calculul activităţii enzimelor necesare la diferite determinări, pentru sistemele indicatoare şi auxiliare, este discutat de Richterich (1).

Scanned with OKEN Scanner

Modul de lucru în cazul testelor optice

În principiu tehnica de lucru este aceeaşi pentru toate cele 100 enzime care se pot determina prin testele optice.

Aparatură. Este necesar un fotometru cu lumină monocromatică de 340 *nm* sau 366 *nm* (de exemplu Specol, spectrofotometrele VSU-1, VSU-2, colorimetru cu lampă de mercur şi filtre de interferenţă). Cuvele trebuie termostatate la 25°C sau 37°C. Se recomandă cuve de 1 *cm*, care necesită la Specol un volum de 0,5 *ml*. Se pot folosi şi microcuve de cuarţ sau chiar de sticlă (pentru Specol) cu volume finale de 0,2—0,4 *ml*. Adaptarea unui înregistrator uşurează munca şi creşte randamentul; durata determinării se reduce de la 4—6 minute, în cazul citirii manuale a extincţiei, la 1—2 minute.

Reactivi: 1. Soluţia tampon recomandată este trietanolamina (excepţie creatin kinaza), care posedă o regiune optimă de tamponare la *pH* 7,5 şi are efecte bacteriostatice şi fungistatice. Se utilizează timp de o săptămînă. Adausul de EDTA la tampon completează urmele de metale grele care inhibă activitatea enzimatică. În cazul creatin kinazei şi sorbitol-dehidrogenazei nu se adaugă EDTA.

2. Coenzimele sînt de regulă foarte scumpe, de aceea nu se vor dizolva decît cantităţi foarte mici conservate în stare congelată. $NADH_2$ este mai stabil în soluţie uşor alcalină. Deoarece $NADH_2$ se descompune spontan foarte rapid obţinîndu-se analogi ai coenzimei cu efecte inhibitorii asupra unor izoenzime ale LDH, la determinarea LDH se folosesc întotdeauna soluţii proaspete de $NADH_2$. În sistemele auxiliare sau indicatoare excesul din soluţia de bază este aşa de mare încît practic nu se produce acţiunea inhibitoare.

3. Substratele se păstrează sub formă congelată timp de săptămîni şi chiar luni. Se aruncă soluţiile tulburi.

4. Enzimele sînt foarte scumpe. De aceea se dizolvă doar cantităţi foarte mici. Enzimele purificate prin precipitare cu sulfat de amoniu se dizolvă în apă distilată şi nu în soluţii tampon. Se recomandă măsurarea activităţii în soluţie de bază, din care se adaugă în probe, pentru a avea o activitate suficientă a sistemelor indicatoare şi auxiliare.

Modul de lucru. În general se recomandă să se prepare un amestec de incubare în care se introduce proba (de exemplu serul) şi se urmăreşte variaţia extincţiei 1—2 minute. Dacă extincţia este perfect staţionară se declanşează reacţia prin adausul de substrat specific şi se notează extincţiile timp de cîteva minute. În cazul majorităţii testelor optice nu este necesar să utilizăm un martor (fără substrat) fiindcă dacă există reacţii secundare se consumă substratul şi acestea se observă în faza de incubare dacă nu se produce stabilizarea extincţiei. Cantitatea de ser luată în lucru, (20—100 *µl*) determină durata analizei.

Scanned with OKEN Scanner

5.4. Calculul activităţii enzimatice

5.4.1. UTILIZAREA SIMULTANĂ A UNUI STANDARD

Se pot utiliza preparate comerciale de seruri standard cu o activitate enzimatică cunoscută sau enzime purificate. În practică aceasta se face rar fiindcă activitatea enzimelor purificate nu este suficient de constantă pentru standardizare, iar serurile standard sînd destul de scumpe.

În locul utilizării unei cantităţi cunoscute de enzimă este mai practică folosirea unei cantităţi cunoscute de substrat sau a unui produs prin care măsurăm dispariţia substratului sau apariţia produsului (de exemplu la fosfataze). Dacă se utilizează acelaşi volum de material de analizat (ser, LCR, urină, omogenat etc.) şi acelaşi volum final de reacţie, atît pentru standard cît şi pentru proba de analizat, calculul activităţii enzimatice se face după formula:

$$UI = \frac{E_P}{E_S} \cdot CM \cdot 10^6 \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{VF}{VA}\ \mu mol \cdot \min^{-1} \cdot l^{-1} \qquad (5.6)$$

VA = volumul materialului de analizat în *ml*
VF = volumul final în *ml*.
CM = concentraţia substratului, respectiv a produsului în *moli* la 1000 *ml*.
E_p = extincţia probei, E = extincţia standardului
t = durata de incubare în minute.

Formula 5.6 derivă din formula 4.16 ţinînd cont de exprimarea în *µmoli* (deci se înmulţeşte cu 10^6), pe minut (se împarte cu timpul) şi de diluţie (VF/VA).

5.4.2. UTILIZAREA COEFICIENTULUI MOLAR DE EXTINCŢIE

Dacă măsurarea se face prin fotometrie în lumină monocromatică (de exemplu folosind una din liniile mercurului), cu ajutorul pipetelor precis etalonate şi a cuvelor plan paralele, se poate folosi coeficientul de extincţie a substratului sau a produsului pentru calculul direct al activităţii enzimatice. În metodele cinetice se notează extincţia la diferite intervale de timp şi se calculează variaţia extincţiei pe minut. Se foloseşte apoi formula:

$$UI = \frac{\Delta E/\text{min.}}{\varepsilon \cdot d} \cdot 10^6 \frac{VF}{VA} \cdot \mu mol \cdot \min^{-1} \cdot l^{-1} \qquad (5.7)$$

$\Delta E/\text{min.}$ = variaţia extincţiei probei pe minut
VA = volumul materialului de analizat (sursa de enzimă) în *ml*

Scanned with OKEN Scanner

VF = volumul final în *ml*
d = grosimea cuvelor în *cm* (drumul razei de lumină)
ε = coeficientul molar de extincţie al substratului sau al produsului.

Formula 5.7 derivă din relaţia 4.18, în care în locul extincţiei se introduce $\Delta E/\text{min}$, diluţia probei este VF/VA şi se înmulţeşte cu 10^6 pentru a exprima rezultatul în micromoli. În metodele enzimatice descrise în partea specială se utilizează pentru calcul direct formula 5.7, înlocuindu-se cu datele metodei descrise. În cazul schimbării condiţiilor de lucru (VF, VA etc.) se vor face înlocuirile corespunzătoare şi în formula de calcul.

Dacă se utilizează şi un martor se foloseşte formula:

$$UI = \frac{\Delta E/\text{min.(probă)} - \Delta E/\text{min.(martor)}}{\varepsilon \cdot d} \cdot 10^6 \cdot \frac{VF}{VA} \qquad (5.8)$$

5.4.3. | METODA GRAFICĂ

În toate metodele cinetice în care se măsoară variaţiile de extincţie (fie manual, fie prin înregistrare) se poate folosi o metodă grafică (1) cu condiţia ca reacţia să fie din punct de vedere cinetic de ordinul zero.

Se repezintă grafic pe hîrtie milimetrică variaţia de extincţie în funcţie de timp, la o scară convenabilă, de pildă pentru fiecare minut se iau 2 *cm* şi pentru o variaţie de extincţie de 0,1 se iau 4 *cm*. Se unesc punctele experimentale printr-o dreaptă. Se calculează tangenta dreptei ($\text{tg}\alpha = \Delta E/t_{min}$), apoi se calculează activitatea enzimatică după formula:

$$UI = \text{tg}\alpha \cdot \frac{10^6}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{VF}{VA} \cdot \frac{v}{b}\ \mu mol \cdot min^{-1} \cdot 1^{-1} \qquad (5.9)$$

VA = volumul materialului de analizat în *ml*
VF = volumul final în *ml*
v = distanţa pe abscisă în *cm* corespunzătoare la 1 minut
b = distanţa pe ordonată care corespunde la o extincţie de 1,0 (în cazul nostru 40 *cm*).
ε = coeficientul molar de extincţie al substratului sau al produsului.

Pentru o anumită reacţie ε, VF, VA, v şi b sînt constante şi se determină o constantă a sistemului, calculul fiind simplificat:

$$f = \frac{10^6}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{VF}{VA} \cdot \frac{v}{b}\ ;\ UI = tg\alpha \cdot f\ \mu mol \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1^{-1}$$

Scanned with OKEN Scanner

În cazul folosirii înregistratoarelor care măsoară variaţia extincţiei în timp, se face calculul direct de pe grafic şi atunci:

v = viteza de deplasare a hîrtiei în *cm*/min. (de exemplu 2 *cm*/min)

b = lărgimea hîrtiei în *cm* corespunzătoare unei extincţii de 1,0.

Dacă înregistratoarele înregistrează variaţia de transmisie atunci se notează valorile transmise la diferite momente (de exemplu din 30 în 30 secunde, sau la 1 minut), se transformă valorile transmisiei în extincţie (vezi la anexa) şi acestea se reprezintă grafic pe hîrtie milimetrică în funcţie de timp.

5.4.4. | EXEMPLE DE CALCUL

a. Se determină activitatea glutamico-oxalacetico-transaminazei serice după tehnica de la pag. 311. Se lucrează la 366 *nm*, în cuvă de 1 *cm*, şi se citesc următoarele valori de extincţie, calculînd ΔE/min:

t(minute)	E	ΔE/min.
0	0,298	
1	0,279	0,019
2	0,257	0,022
3	0,240	0,017
4	0,215	0,025
	Total	0,083
	ΔE/min =	0,083/4 = 0,0208

$VA = 0{,}1$ *ml* ser, $VF = 0{,}7$ *ml*; coeficientul molar de extincţie a $NADH_2$ este: $6{,}22 \cdot 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$ la 340 *nm* şi $3{,}30 \cdot 10^3\ M^{-1}\ c,^{-1}$ la 366 *nm*. Se înlocuiesc datele în formula (5.7)

$$UI = \frac{0{,}0208}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}7}{0{,}1} \cdot 10^6 = 44{,}1\ \mu moli \cdot \text{min.}^{-1} \cdot 1^{-1}$$

b. Grafic se reprezintă extincţia în funcţie de timp pe hîrtie milimetrică luînd pe abscisă 2 *cm* pentru un minut şi pe ordonată 4 *cm* pentru o extincţie de 0,1. Tangenţa dreptei are valoarea: $\text{tg}\alpha = 0{,}414$. Înlocuind în formula (5.9) obţinem:

$$UI = 0{,}414 \cdot \frac{10^6}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}7}{0{,}1} \cdot \frac{2}{40} = 44{,}0\ \mu moli \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1^{-1}$$

Scanned with OKEN Scanner

c. Dacă aceeaşi analiză se face la 340 *nm* avem datele experimetale următoare:

t(min.)	E	ΔE/min.
0	0,560	
1	0,525	0,035
2	0,484	0,041
3	0,451	0,033
4	0,404	0,047
	Total	0,156

$$\Delta E/\text{min.} = \frac{0,156}{4} = 0,039$$

5.4.5. | REACŢII NELINIARE

Pînă aici toate reacţiile discutate au fost de ordinul zero. Dacă reacţia enzimatică este de alt ordin, din punct de vedere cinetic se consideră ca viteză a reacţiei viteza iniţială (v_0 la $t = 0$.) În cazul reacţiilor neliniare de obicei viteza descreşte cu timpul. Pentru determinarea vitezei iniţiale se fac măsurătorile începînd cît mai repede după startul reacţiei şi apoi se reprezintă grafic valorile obţinute. Se extrapolează curba la $t = 0$ şi se duce tangenta în acest punct (fig. 15). Pentru aceasta se foloseşte metoda oglinzii. Se aşează vertical pe planul hîrtiei o oglindă care se ţine perpendicular pe curbă în aşa fel încît curba să apară pe oglindă fără întrerupere. Linia trasă în lungul oglinzii este perpendiculară pe tangentă în punctul în care oglinda întretaie curba. Un calcul mai precis se poate face dacă se reprezintă grafic valorile tangentelor ($\Delta E/\Delta t$) în funcţie de timp (t) sau în funcţie de concentraţie ($\Delta c/\Delta t$ sau $\Delta E/\Delta t$ faţă de c) şi apoi se extrapolează la momentul zero.

Dacă înregistratorul notează valorile de transmisie, se duce la fel tangenta în punctul iniţial prin metoda oglinzii şi transformarea variaţiei de transmisie în variaţie de extincţie se face după formula:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{1}{2,3 \cdot T} \cdot \frac{dT}{dt} \qquad (5.10)$$

unde T este valoarea transmisiei în punctul în care s-a dus tangenta.

5.5. | Surse de eroare

În cazul analizelor enzimatice trebuie eliminate următoarele surse de eroare, în cazul în care se obţin rezultate dubioase:

a. Fotometrul: se controlează dacă se lucrează cu filtrul sau lungimea de undă potrivită, cuva potrivită (plasată corect). Verificarea legii lui Lambert—Beer: se dizolvă aproximativ 100 *mg* fericianură de K în 500 *ml* apă distilată. Se diluează această soluţie cu apă distilată 1 : 1, 1 : 3 şi 1 : 7. Se măsoară extincţiile soluţiilor la 366, 340 şi 334 *nm*, respectiv cu filtrele pentru aceste lungimi de undă şi lampă de mercur la fotometrele cu linii spectrale. Raportul extincţiilor trebuie să fie respectiv: 1 : 0,5, 1 : 0,25 şi 1 : 0,125.

b. Sticlăria murdară, apa distilată contaminată.

c. Reactivii cu termenul de stabilitate expirat, contaminaţi cu microorganisme.

d. Serul inactivat prin păstrarea prelungită sau prea activ (în acest caz se repetă dozarea cu ser diluat).

e. Temperatura incorectă, timpul de incubare neadecvat, reactivii scoşi din frigider nu au ajuns la temperatura de lucru, *pH* soluţiei necorespunzător.

f. Eroare de pipetare.

g. Dacă densitatea optică iniţială este prea mare se stabileşte punctul zero al fotometrului faţă de o cuvă ce conţine acid citric diluat (o picătură acid citric 1,2% în 100 *ml* apă) sau se creşte sensibilitatea fotometrului dacă acesta este prevăzut cu asemenea instalaţie (extensie de scală).

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique théorique et practique.* Doin Deren & C^ie, Paris, 1967; Bergmeyer, H.U., *Methods of enzymatic analysis,* Verlag Chemie GMBH Weinhein/Bergstr, Academic Press, New York and London, 1965; Schmidt, E., Schmidt, F. W., *Guide to practical enzyme diagnosis,* Boehringer Mannhein GMBH, 1967; Harrow, B., *Textbook of biochemistry,* 10th edition, W. B. Saunders Comp., Philadelphia—London—Toronto, 1971. Working Instructions, Biochem Test Combinations, Boehringer, 1973; Mazur, A.,

6. | ULTRAMICROANALIZA ÎN LABORATORUL CLINIC

Progresul tehnic înregistrat în ultimii 20 ani de laboratorul clinic a înregistrat miniaturizarea tehnicilor de dozare. Astfel, s-a trecut de la determinări pe cantităţi de cîţiva *ml* de ser sanguin la

Scanned with OKEN Scanner

determinări pe cantităţi de 0,1—0,5 *ml.* Mai recent au apărut şi ultramicrometodele care necesită sub 0,05 *ml* (50 µl) prelevat de dozare, de obicei 10—20 µ*l*. Acestea se mai numesc şi „metode la microlitru" (metode microlitrice sau micrometode).

De la început trebuie precizat că: a) în general eroarea în ultramicroanaliză este de acelaşi ordin de mărime ca cea din microanaliză; b) metodele ultramicroanalitice nu sînt inaccesibile laboratoarelor clinice din ţara noastră; ele necesită un minim de materiale, cunoaşterea unor noţiuni teoretice, o iniţiere practică răsplătită în schimb prin mari avantaje.

În laboratorul clinic există două domenii principale de aplicare a ultramicroanalizei: 1) efectuarea analizelor curente pe lichide biologice (ser, urină, LCR); 2) determinări pe ţesuturi.

6.1. | Determinări pe lichide biologice

De la primele lucrări ale lui O. H. Lowry şi col. (1946, 1948) privind determinarea fosfatazei alcaline pe 5 µ*l* ser şi a fierului pe 20 µ*l*, un număr tot mai mare de autori au constatat că micrometodele prezintă avantaje faţă de metodele convenţionale şi că majoritatea testelor pot fi efectuate la această scară cu foarte bune rezultate.

Avantajele se pot sistematiza în felul următor:

1) *Pentru subiectul examinat.* Pe lîngă beneficiile pe care le pot trage persoanele sănătoase supuse unor explorări sistematice sau probelor de încărcare (prin prelevarea unei cantităţi foarte mici de sînge, de cele mai multe ori doar din pulpa degetului), sînt mult mai importante avantajele pentru anumite categorii de bolnavi: nou-născuţi, în special cei supuşi reanimării, sugari, distrofici, la care problemele pe care le pune recoltarea sîngelui face dificilă o explorare completă la scara analitică actuală; de asemenea bolnavii din serviciile de reanimare, la care se face un control continuu al parametrilor biochimici.

2) *Pentru biochimist.* Determinările se pot efectua întotdeauna pe două probe paralele, iar în caz de dubiu se poate repeta dozarea, deoarece rar se întîmplă ca prelevatul să fie insuficient. Sub aspect tehnic multe operaţii ultramicroanalitice se efectuează mai rapid decît la scara macro. De exemplu, o pipetare cu o micropipetă *Sanz* necesită 10 *sec.*, faţă de 30 *sec.* cu pipetele obişnuite. Citirea la un colorimetru, cu o microcuvă cu umplere şi golire automată, necesită 15 *sec.*, iar o titrare cu o ultramicrobiuretă cca. 30 *sec.* În plus, în acest fel se pot efectua determinări prin metode moderne (ca cele enzimatice) la un preţ de cost scăzut, uneori mai mic decît costul reactivilor utilizaţi în metodele „clasice".

Scanned with OKEN Scanner

3) *Pentru clinician.* Micrometodele permit o explorare sistematică, atît la copil, cît și la adult, ori de cîte ori clinicianul consideră necesar aceasta. De fapt, un bilanț ionic complet se poate efectua pe 20 *µl* plasmă (50 *µl* sînge) și dacă se efectuează 20 dozări pe zi a cîte 0,5 *ml* sînge, aceasta reprezintă abia 10 *ml* pe 24 ore. Apoi, clinicianul poate cere noi tipuri de examinări în fața cărora s-a ezitat pînă acuma, de exemplu constituenții care se află în lichidele biologice în cantități de ordinul microgramelor.

4) *Avantajele economice.* Sînt și ele importante pentru că laboratoarele sînt mai puțin extinse și se elimină o cantitate importantă de sticlărie (ureometre, biurete, eprubete clasice, tuburi de centrifugă). Economia cea mai însemnată se realizează însă la reactivi. În condițiile noastre, unde o bună parte din reactivi sînt procurați din import, aceasta înseamnă o importantă economie. Practic, a lucra la această scară revine la a lucra cu reactivi în cantitate de 10—20 ori mai mică decît pentru o analiză curentă.

6.1.1. | RECOLTAREA SÎNGELUI CAPILAR

Determinările micro se pot efectua fie pe sînge venos, fie pe sînge capilar. Evident că ultima soluție reprezintă unul din avantajele acestor tehnici. Este interesant că prima tehnică de prelevare a sîngelui capilar este descrisă în 1912 de A. E. Wright și L. Colebrook, dar nu s-a putut aplica în analizele de rutină decît odată cu creșterea sensibilității metodelor de determinare.

Prelevarea sîngelui capilar se poate face din pulpa degetului, din călcîi (la nou-născut) și din lobulul urechii (în starea de șoc). La început se produce o hiperemie locală prin frecare, baie caldă sau compresie cu alcool. Se dezinfectează pielea cu alcool 70% sau mai bine cu eter, fiindcă în acest caz sîngele rămîne în picătură și nu se împrăștie pe suprafața pielii. În plus, orice urmă de alcool produce hemoliză. La copii aflați în incubatoare nu se va folosi eterul. Unii autori recomandă ungerea pielii cu un strat subțire de alifie hidrofobă (vaselină) cu o lanțetă sterilă cu care se ia o cantitate cît o gămălie de ac. Se vor folosi lanțete sterile care se vor arunca după utilizare. În cazul cînd se recoltează sînge din călcîi, nu se va înțepa rapid, ca în cazul prelevării din pulpa degetului, ci se va face o puncție deliberată a venei mici situată posterior de maleola internă. După înțepare se așteaptă pînă se formează spontan o picătură suficient de mare și apoi se atașează recipientul de colectare a sîngelui. Pentru a nu se produce hemoliza și contaminarea cu fluid tisular, este esențial să se obțină o curgere liberă a sîngelui. Nu se va face nici un fel de „stoarcere" la locul de prelevare. Dacă totuși sîngele nu curge, se va produce hiperemie prin

Scanned with OKEN Scanner

frecarea gambelor, în cazul prelevării din călcîi, tampon cu alcool 70%, pe ureche, frecarea degetelor, în cazul prelevării din pulpa digitală.

Sîngele se recoltează în diferite recipiente:

1. Capilare de sticlă, heparinate, de diferite dimensiuni: 149×1,5 *mm* diametrul interior (Natelson), 75×2 *mm* (Caraway), 75×1 *mm* (trusa Merckotest pentru aminoacizi plasmatici).

Umplerea se face prin gravitaţie şi capilaritate, ţinînd capilarele aproape orizontal în picătura de sînge. Se închid la capete cu o substanţă plastică (ceară, parafină) sau se lipeşte cîte o bucată de hîrtie. Se amestecă bine şi se transportă în laborator unde se centrifughează într-o eprubetă obişnuită sau mai bine de plastic. Se pot obţine astfel 100 µg ser. Înainte de centrifugare unul din capete se înfige cu grijă într-un strat de parafină de 2—3 *mm* turnat într-o placă. Petri. Cînd tubul a ajuns la fundul plăcii (ceea ce se poate controla privind pe sub placă) se scoate uşor tubul şi astfel rămîne un dop de parafină.

2. Microeprubete de sticlă. Se recomandă în special în cazul recoltării din călcîi, la nou-născut. Pot avea diferite dimensiuni: 6×50 *mm* (Caraway), 10 × 37 *mm* (Wilkinson). Sîngele trebuie să curgă liber în tub şi nu se va atinge tubul de piele fiindcă se produce hemoliză (dar se poate atinge de picătura de sînge). Această metodă presupune o îndemînare tehnică. În cazul în care se recoltează plasma, în tub se va pune 0,01 *ml* (10 *U*) soluţie apoasă de heparină şi se acoperă cu un strat de ulei mineral. Astfel sîngele care picură vine întîi în contact cu acesta şi apoi cu heparina.

3. Recipiente din plastic (polietilenă), care actualmente tind să le înlocuiască pe cele din sticlă. Au o capacitate de 0,4—0,5 *ml* (Sanz); se umple cît mai mult tubul şi apoi se acoperă cu un dop adecvat.

4. Prelevarea direct în recipientul de reacţie. Metodele ce folosesc sîngele integral sînt ideale. Astfel, pentru microdeterminarea hematocritului se recoltează sîngele direct în capilarul respectiv, iar pentru glicemie se pune 20 µl sînge direct în 0,2 *ml* acid percloric conc. (70%).

Pentru pipetarea serului ori a plasmei se poate tăia recipientul din polietilenă cu o lamă de ras, iar tuburile heparinate cu o pilă de tăiat fiole la limita dintre celule şi plasmă, iar apoi cu micropipeta se prelevează direct serul ori plasma. Se poate recupera capilarul în cazul în care a fost astupat cu dop de parafină în modul descris mai sus, împingînd uşor dopul cu o baghetă subţire de sticlă sau cu o sîrmă de dimensiuni potrivite avînd capătul aplatizat.

Se pune problema diferenţelor dintre sîngele venos şi cel capilar. Teoretic, ne-am putea aştepta la modificări în cursul stazei venoase în primul caz şi la pericolul de hemoliză şi de trecere a lichidului din spaţiul interstiţial în spaţiul intern al vaselor în al doilea caz. Kaplan şi col., comparînd concentraţiile colesterolului, clorului, glucozei, pota-

Scanned with OKEN Scanner

siului, ureei, calciului, fosforului, proteinelor totale și albuminelor, în sîngele venos față de cel capilar găsesc diferențe doar la glucoză, unde valoarea este mai mică în sîngele venos. Alți autori au încercat să demonstreze diferențe în conținutul de hemoglobină dar rezultatele sînt contradictorii și o diferență importantă este improbabilă. Vink analizează calciul și proteinele totale, avînd în vedere diferențele mari de concentrație între spațiul intravascular și cel interstițial, fără a găsi vre-o diferență semnificativă. În concluzie, se poate spune că doar glucoza este în concentrație mai mică în sîngele venos și lactatul și piruvatul în concentrație mai mare față de sîngele capilar.

6.1.2. | TEHNICI GENERALE ULTRAMICROANALITICE

A. *Colorimetria și spectrofotometria*

Condiția esențială pentru aplicarea procedeelor colorimetrice și spectrofotometrice în ultramicrochimie este procurarea de cuve potrivite. Acestea trebuie să îndeplinească mai multe condiții:

— volumul necesar pentru măsurare să nu depășească 400 μl;

— lungimea razei de lumină să fie de circa 1 *cm*;

— materialul să fie cît mai rezistent la substanțele chimice folosite;

— umplerea și curățirea să fie ușoară;

— suprafața interioară trebuie să fie perfect umectabilă, pentru a nu se forma bule de aer care interferează în măsurători și să nu se formeze picături de lichid care să adere de perete la golirea cuvei. Sanz arată că lucrînd în condiții bune, volumul rămas în cuvă, după golirea prin aspirație timp de 5 minute a 100—200 μl lichid, este de 1 μl, adică 0,5—1% din volumul inițial. De aceea spălarea nu este necesară dacă diferențele dintre probe nu sînt prea mari.

Printre modelele de cuve adecvate amintim:

Cuva Lowry și Bessey (fig. 22) care are doi pereți paraleli subțiri, la 1 *cm* unul de altul și doi pereți groși la o distanță de 2 *mm*, astfel că forma exterioară este similară cuvelor obișnuite, deci nu necesită alinierea în fascicol. Se face din cuarț și îndeplinește toate condițiile de mai înainte. Poate fi folosită și cu volum de 50 μl. Ca dezavantaje citățm: indiferent de volum (50—200 μl) sensibilitatea este limitată de drumul razei de 1 *cm*; este necesară o mască de metal pentru a preveni transmisia luminii prin sticlă ori cuarțul din care se fabrică; la volum de 50 μl tehnica adăugării reactivilor și dezvoltarea culorii devin dificile.

Sanz descrie o cuvă formată dintr-un tub de sticlă turtit, astfel că nu există nici un perete neted, prevăzută cu o deschidere la fund.

Scanned with OKEN Scanner

Se foloseşte cu volume de 150—200 μl, la un tip special de colorimetru la care este fixată.

Sensibilitatea cea mai mare se obţine cu o cuvă descrisă de Kirk, Rosenfels şi Hanahan, formată dintr-un tub capilar cu diametrul de 2 *mm* şi de 5 *cm* lungime. Sensibilitatea este de 5 ori mai mare la volum de 50 μl, permite o adăugare uşoară a reactivilor şi dezvoltarea culorii. Dezavantajul este necesitatea unui dispozitiv special de susţinere şi de aliniere a cuvei în fascicolul de lumină al spectrofotometrului.

Aceiaşi autori descriu şi o cuvă mai mare, cu diametrul de 4 *mm*.

S-au construit şi aparate speciale: colorimetrul cu înregistrare al lui Solomon şi Caton şi microspectrofotometrele Walach-Surgenor şi Beckman. De asemenea Stewart şi col. folosesc în clinica umană spectrofotometria în infraroşu adaptată la scară ultramicroanalitică.

Este preferabil ca aparatele cu care se lucrează în ultramicroanaliză să poată fi utilizate şi în analizele convenţionale. Aparatele din laboratoarele din ţara noastră („Spekol", spectrofotometrul VSU-2, C. Zeiss, Jena) au între accesorii şi microcuve, la Spekol existînd chiar o microcuvă cu umplere şi golire automată.

În lipsa microcuvelor speciale se poate folosi următorul dispozitiv de transformare a cuvelor obişnuite în microcuve (descris de G.

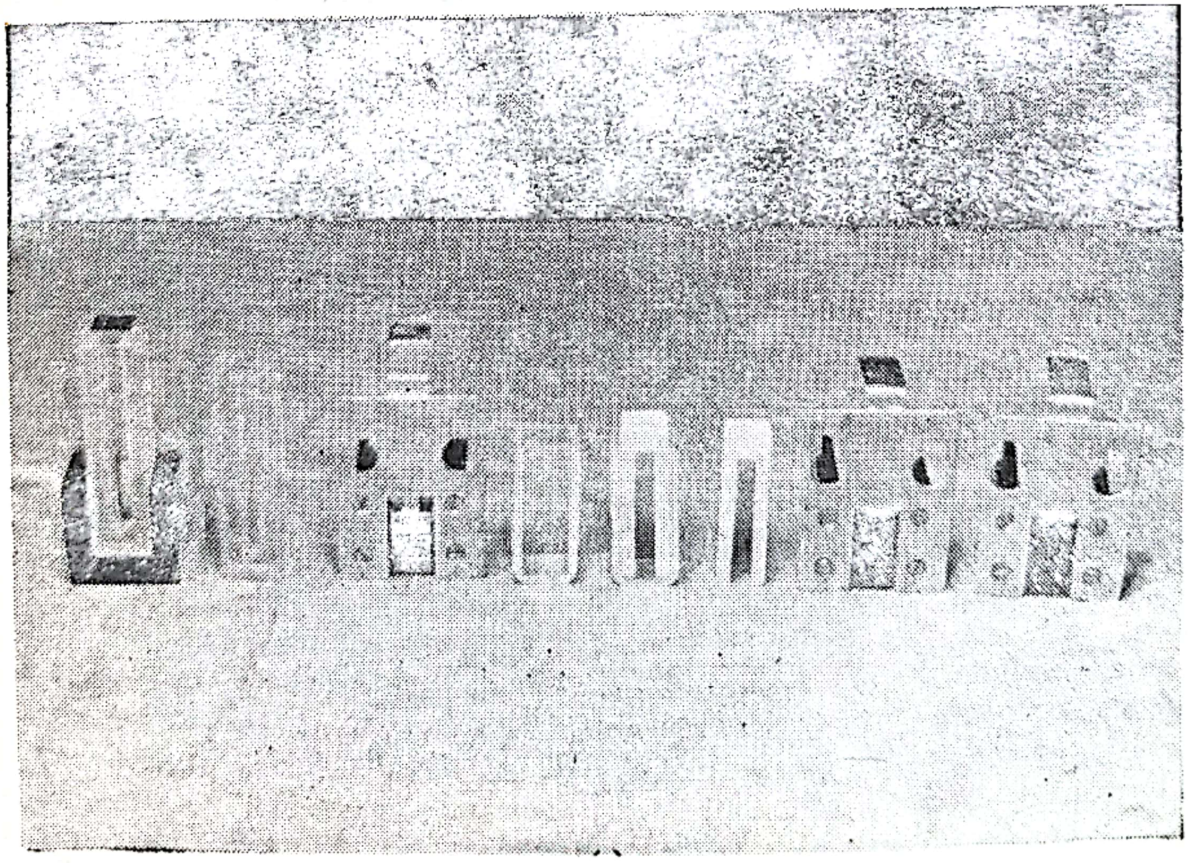


Fig. 22. **Diferite tipuri de microcuve.**

Scanned with OKEN Scanner

Benga şi tehnician I. Luca). În esenţă s-a căutat micşorarea volumului cuvei prin introducerea în interior a unor corpuri care să ocupe volumele situate lateral de fascicolul de lumină. S-au executat două variante: din plastic şi sticlă.

În varianta „plastic" s-au confecţionat două piese în formă de U adaptate perfect pereţilor cuvei. Spaţiul dintre cele două braţe este de 3,5 *mm*, ceva mai mare lăţimea fasciculului de lumină al spectrofotometrului VSU-1, Zeiss-Jena. După introducerea lichidului de citit în cuvă, se introduce şi piesa de plastic şi astfel nivelul lichidului urcă pînă la o înălţime suficientă pentru a ocupa întreg fasciculul de lumină. Materialul plastic utilizat rezistă la acţiunea reactivilor, cu excepţia cloroformului. În varianta „sticlă" s-a confecţionat aceeaşi piesă din sticlă. Acest dispozitiv are avantajul de a permite utilizarea cuvelor şi la citirile obişnuite.

Pentru laboratoarele care dispun de mai multe cuve se poate face o transformare definitivă a cuvei în microcuvă prin lipirea pe pereţii laterali ai cuvei a unor piese de sticlă de forma indicată în fig. 22, ceea ce înlătură necesitatea scoaterii la fiecare citire a pieselor descrise anterior. Microcuvele astfel confecţionate se pot utiliza la aparatul „Spekol" şi la spectrofotometrul VSU-1 Zeiss-Jena. În acest ultim caz este necesară însă şi confecţionarea unor suporturi speciale din material plastic negru, prevăzute cu o deschidere anterioară tot de 3 *mm*.

Kirk (5) face o serie de recomandări speciale pentru cazul cînd se lucrează la volum de 1 *ml*, 200 µ*l* şi 50 µ*l*.

Astfel, în primul caz se foloseşte cuva Kirk cu diametrul de 4 *mm*., în cuvă punîndu-se 0,6 *ml*, restul reactivilor servind pentru spălare. Volumul de 1 *ml* se poate măsura în vase gradate de 1 *ml*, iar lichidul este introdus în cuvă cu o pipetă adaptată la o seringă. După aceea se face o examinare a cuvei pentru a vedea dacă nu s-au format bule de aer, în care caz trebuie să se extragă o parte din lichidul din cuvă. Dacă pentru reacţiile de culoare trebuie să se fiarbă lichidul, aceasta nu se va face în microeprubete, fiindcă se pierde o parte din lichid, ci în tuburi mai mari.

La volum de 200 µ*l*, reactivii trebuie să fie foarte concentraţi şi se lucrează în cuva Kirk cu diametrul de 2 *mm* sau în cuva Lowry şi Bessey. Spălarea pipetei cu soluţia de măsurat este foarte importantă şi se face de două ori cu cîte o picătură de lichid mai mică decît volumul pipetei. Aceste două spălări sînt aproape la fel de eficiente ca şi spălările cu întreg volumul şi mult mai bune ca o singură spălare cu întreg volumul pipetei. Dacă se lucrează în tuburi mici gradate, trebuie să se centrifugheze puţin la turaţie joasă înainte de a se aduce la semn, altfel eroarea este foarte mare. Dacă lichidul trebuie încălzit

Scanned with OKEN Scanner

operaţia nu se va face în vase descoperite fiindcă se evaporă uşor la volum aşa de mic.

Kirk recomandă următorul procedeu pentru reacţiile de culoare la volum de 200 μl: se pun reactivii de culoare şi se aşteaptă dezvoltarea culorii într-un tub microtest la un volum considerabil mai mic de 200 μl. Apoi soluţia este aspirată cu grijă într-o micropipetă de 200 μl. Tubul se spală, iar din lichidul de spălare se trage în pipetă pînă la 200 μl. Amestecarea se face pe o suprafaţă parafinată golind şi aspirînd conţinutul pipetei de mai multe ori. Deşi se fac mai multe operaţii în exterior este preferabil aşa decît să intre bule de aer în tubul volumetric.

La volum de 50 μl: se folosesc fie cuva Lowry şi Bessey la capacitatea minimă, fie cea capilară de 5 *cm* lungime şi diametrul de 1 *mm*. Există mari dificultăţi la adăugarea reactivilor şi aducerea la volum. O tehnică potrivită este cea folosită de Brüel, Holter, Linderström-Lang şi Rozits (cit. 5). Pe suprafaţa unui bloc de parafină curată sau teflon se adaugă diferiţi reactivi în picături separate şi o picătură de apă, care în total realizează ceva mai puţin de 50 μl. Proba măsurată cu pipeta cu autoumplere („self-filling") este descărcată în această picătură care serveşte şi la spălarea pipetei. Se ia apoi o pipetă de 50 μl cu care se culeg toate picăturile, se face amestecul prin golire şi aspirare pe bloc, apoi, după adăugarea ultimului reactiv, se aduce pipeta la marcă, aspirînd apă dintr-o altă picătură de apă de pe suprafaţa blocului de parafină. Se face apoi o amestecare finală după care cantitatea de 50 μl se toarnă în cuvă.

B. *Fluorimetria*

Aplicaţiile fluorimetriei.

1) Determinarea cantitativă a multor enzime pe baza fluorescenţei caracteristice a coenzimelor. Astfel, piridinnucleotidele reduse au o fluorescenţă nativă mare.

Formele oxidate ale piridinnucleotidelor, dau derivaţi fluorescenţi prin încălzire în alcalii, singure sau cu compuşi cu grupe carbonil. Aceste proprietăţi sînt folosite în determinarea următoarelor enzime: LDH (metoda Lowry şi col.) (care permite determinarea pe o singură celulă nervoasă), G-6-P-dehidrogenaza, glutamicodehidrogenaza, transaminazele serice, succinico-semialdehid-dehidrogenaza, malicodehidrogenaza.

2) În studii de cinetică enzimatică, fluorimetria se dovedeşte capabilă să măsoare constantele de desociere şi K_m ale complexelor enzimă-substrat sau enzimă-coenzimă la ordine de mărime de cîteva ori mai mici decît cele măsurabile prin spectrofotometrie.

3) Altă aplicaţie este în studiile pe celule intacte sau particule subcelulare în care se urmăresc modificările piridinnucleotidelor. De

Scanned with OKEN Scanner

exemplu, spectrul fluorescenţei NADH-ului liber se caracterizează printr-un maxim la 460 *nm*, care se schimbă la 440 *nm* cînd NADH-ul este legat de unele enzime, concomitent schimbîndu-se şi fluorescenţa. Duissens şi Sweep, în studii pe organisme fotosintetice, constată că prin iluminare fluorescenţa creşte şi spectrul este cel al NADH-ului legat, ceea ce arată că reducerea piridinnucleotidelor însoţeşte reducerea CO_2 în cursul fotosintezei.

Chance şi Legalais descriu un microfotofluorometru diferenţial, care poate fi folosit la urmărirea modificărilor metabolice dintr-o porţiune definită a unei singure celule; cînd apare conversiunea NAD-ului în NADH se produce o creştere a fluorescenţei.

Cu acest aparat se pot obţine spectrele de excitare dintr-un cîmp microscopic şi se pot preciza localizările cu un grad de certitudine, pentru multe reacţii enzimatice din celula vie.

C. *Microtitrarea*

Pentru a se titra cantităţi foarte mici de substanţă, există teoretic două posibilităţi: folosirea de soluţii de reactivi foarte diluate, sau titrarea cu volume foarte mici. Deoarece prima posibilitate introduce erori mari, se folosesc microbiurete cu ajutorul cărora se măsoară cantităţi foarte mici de reactivi cu concentraţie de minimum 0,01 *n*.

Există două tipuri de microbiurete: capilare şi de deplasare (dezlocuire-„displacement biuret").

Dintre cele capilare amintim: Biureta de tip Rehberg, în care soluţia este evacuată printr-o coloană de mercur, a cărei deplasare este controlată printr-o tijă ce pătrunde în rezervorul de mercur iar citirea se face după meniscul mercurului în capilar (fig. 23).

Dezavantajul este că trebuie umplută frecvent, este fragilă, greoaie şi soluţia de titrat fiind în contact cu mercurul produce contaminarea soluţiei.

— Biureta Kirk (fig. 23) înlătură aceste dezavantaje, constînd dintr-un capilar cu diametrul interior de 0,5 *mm*, deci 1 *mm* lungime corespunde la 0,2 *µl*. Este de un volum mai mic şi se poate fixa la orice înălţime aducînd-o deasupra vasului de titrare. Lichidul de titrat, conţinut în întregime în capilar, e separat de mercur printr-o coloană de aer, ceea ce o face sensibilă la modificările de temperatură.

— Biureta Schwarz (fig. 23) controlează scurgerea din capilar prin tensiunea superficială a picăturii de lichid formată la vîrful biuretei care rezistă la o uşoară presiune exercitată cu gura la capătul opus pînă în momentul cînd se atinge suprafaţa lichidului de titrat; lichidul începe să se scurgă în mod uniform atîta timp cît se menţine contactul

Scanned with OKEN Scanner

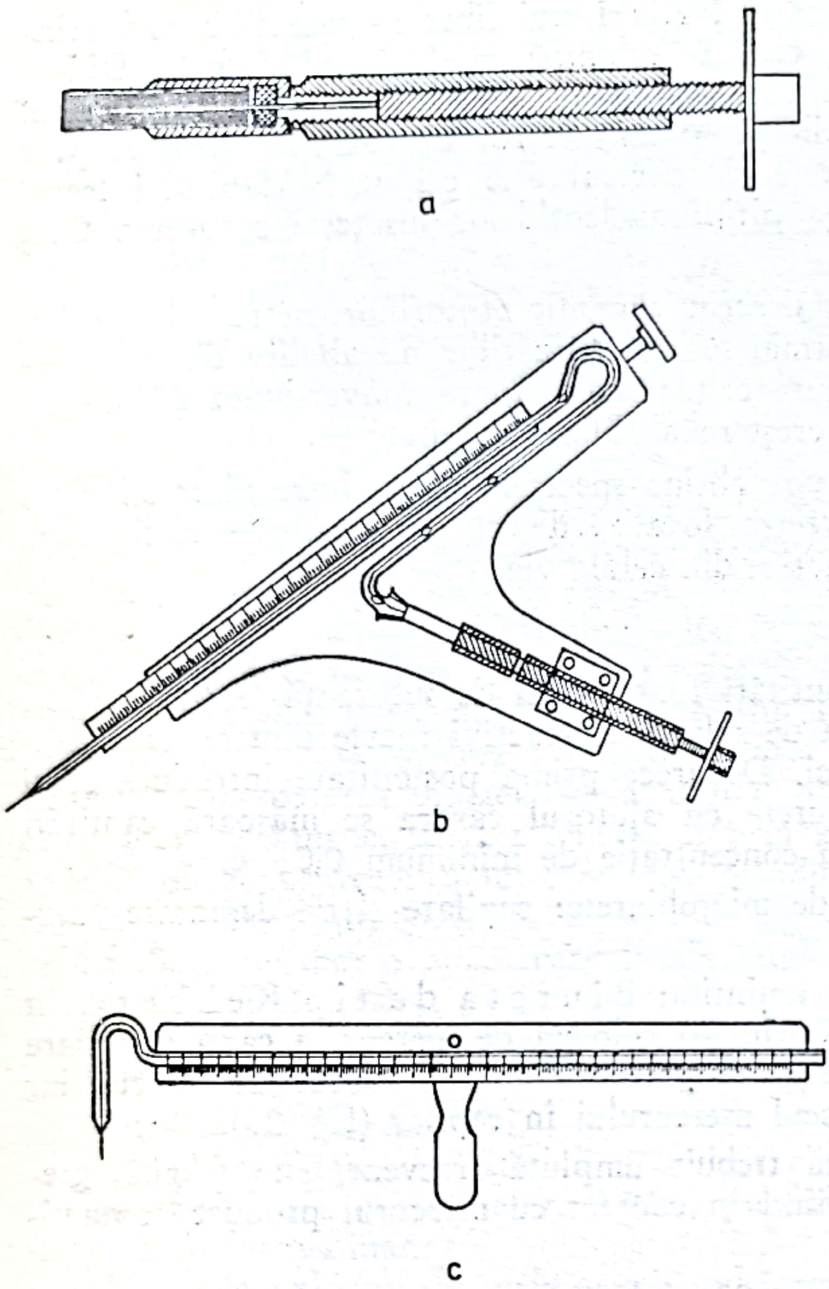


Fig. 23. Diferite tipuri de microbiurete: a) microbiureta Rehberg; b) microbiureta Kirk; c) microbiureta Schwartz (varianta lui Kirk).

dintre vîrful biuretei și lichidul de titrat.

O variantă imaginată de Kirk, ușor de realizat, este cea din fig. 23, în care, prin poziția orizontală a biuretei, se menține o presiune hidrostatică constantă, iar deplasarea lichidului e controlată de imersarea vîrfului. Se poate adăuga un rezervor din care printr-un robinet cu trei căi se umple biureta. Dezavantajul este că necesită un capăt foarte fin. Alte tipuri de microbiurete din această categorie sînt cele ale lui Bennedetti-Pichler și Pecar.

— Biureta de tip Conway, în care se aplică o mică presiune hidrostatică pentru a goli soluția din capilar, oprește fluxul printr-un robinet. Este voluminoasă dar e folosită în multe laboratoare.

La biuretele de deplasare lichidul este împins printr-un piston cu diametrul cunoscut, iar citirea se face la un micrometru. Astfel sînt: biureta de tip Scholander, care conține o cantitate de mercur, ca și cea de tip Rehberg,

— biuretele de tip seringă, în care pistonul se adaptează perfect la diametrul tubului, ca la biureta Trevan sau Natelson.

Agitarea în cursul titrării se poate face prin barbotarea diferitelor gaze în soluție, agitare magnetică sau rotația vasului în care se titrează.

Kirk recomandă pentru titrare farfurioare mici de porţelan, dar mai practice sînt cele de plastic (100—300 μl) care se aruncă după o microtitrare.

Detectarea punctului final se poate face fie vizual, fie colorimetric (de ex. aparatul Holasek), sau potenţiometric.

6.2. | Determinări pe ţesuturi umane

Determinările microanalitice prezintă astăzi o importanţă din ce în ce mai mare reprezentînd unica posibilitate de a efectua o explorare directă a metabolismului celular.

Putem distinge două modalităţi principale de investigare a metabolismului celular: studiul indirect şi studiul direct, ambele putîndu-se efectua în condiţii fiziologice şi patologice.

Studiul indirect se referă la: a) dozarea activităţii enzimelor şi a metaboliţilor din lichidele biologice, determinări care sînt puţin specifice, rezultatele fiind o rezultantă a activităţii metabolice a mai multor ţesuturi; b) probele funcţionale, de încărcare sau de toleranţă, care explorează mecanisme enzimatice particulare. De exemplu, proba galactozuriei provocate evaluează transformarea galactozei în G-1-P., testul acidului hipuric sesizează defecte ale conjugării acidului benzoic cu glicocolul în mitocondriile hepatice. În general, metodele indirecte de explorare, deşi nespecifice, sînt uşor accesibile laboratorului clinic şi au o importanţă diagnostică certă.

Studiul direct al metabolismului celular pe fragmente de ţesut prelevate de la diverse specii este o modalitate de investigare valoroasă. Dacă cercetările pe animal aduc o contribuţie importantă la cunoaşterea diferitelor funcţiuni enzimatice ale celulelor şi servesc la studiul afecţiunilor ce pot fi reproduse experimental, extrapolarea rezultatelor de la animal la om este însă dificilă şi discutabilă.

Studiul pe fragmente de ţesut uman, prelevate în cursul intervenţiilor chirurgicale sau pe puncţii bioptice, este cel mai specific mod de investigaţie. Cantităţile mici de ţesut disponibile (5—40 *mg* la o puncţie biopsie hepatică) impun introducerea metodelor ultramicroanalitice. De aceea, progresele în cercetarea directă a metabolismului celular la om sînt legate de extinderea ultramicroanalizei.

6.2.1. | RECOLTAREA MATERIALULUI

Există trei modalităţi de recoltare a ţesuturilor umane:

1) Material de autopsie, cu marele dezavantaj al modificărilor post-mortem care au loc în toate organele, dar mai ales în ficat, dife-

Scanned with OKEN Scanner

ritele activităţi enzimatice fiind afectate în mod diferit. Chiar dacă se încearcă recoltarea ţesutului imediat post-mortem, nu se poate considera ca reflectînd situaţia reală din organism, avînd în vedere modificările din faza agonală, iar în cazul morţilor subite modificările din cursul şocului.

2) Biopsia intraoperatorie, la care apare dificultatea selectării martorilor. De exemplu, se ştie că ficatul este afectat în orice proces primar al stomacului, intestinului, căilor biliare sau a pancreasului. De aceea nu trebuie neglijat controlul histologic în toate cazurile.

Modul de recoltare al biopsiei este de o mare importanţă. La ficat se recoltează o porţiune de 1—2 g din marginea anterioară, iar dacă incizia nu este suficient de adîncă, se recoltează doar ţesutul subcapsular care nu reflectă situaţia întregului organ. Opitz găseşte, în 80% din 76 biopsii hepatice, o creştere a ţesutului conjunctiv şi dezorganizarea arhitecturii hepatice, care ar putea fi etichetată ca ciroză, pe cînd în restul parenchimului acest tablou lipsea.

Recoltarea unor fragmente de cîteva grame este lipsită de nocivitate, avînd în vedere şi marea capacitate de regenerare a ficatului.

3) Puncţia biopsie are avantajul de a implica riscuri minime ceea ce permite selectarea martorilor şi pe de altă parte face posibilă repetarea examinărilor în cursul bolii. Se exclud dezavantajele biopsiei chirurgicale, putîndu-se considera că ţesutul recoltat este reprezentativ pentru întreg organul. Deoarece cantitatea de ţesut care se recoltează este de cca. 20 *mg* (rareori peste 50 *mg*) apare clar necesitatea folosirii metodelor ultramicroanalitice. Totuşi, în studiile de caracterizare biochimică a fracţiunilor subcelulare (mitocondrii, lizozomi) trebuie lucrat, cel puţin la început, pe fragmente mai mari de ţesut obţinute doar prin operaţie.

6.2.2. | PRINCIPALELE OPERAŢII ANALITICE

În cazul în care se lucrează pe fragmente mici de ţesut trebuie luate precauţii în operaţiile analitice. O regulă generală este aceea ca manipularea fragmentelor să se facă foarte rapid iar toate operaţiile următoare să se execute la rece, avînd în vedere pericolul de desicare şi alterare.

Cîntărirea se face de preferinţă în camera frigider, cu diferite tipuri de microbalanţe, care permit o cîntărire rapidă. În general, pentru cîntărirea probelor mici se poate aplica unul din principiile bazate pe: forţe magnetice sau electrice, deplasarea unui fluid care compensează masa probei de cîntărit sau deformaţia mecanică a unui material (curbarea, întinderea, compresiunea ori torsiunea). Dintre tipurile de balanţe adecvate cîntăririi materialelor biologice amintim: balanţele de torsiune,

Scanned with OKEN Scanner

balanţele electromagnetice (Marsch, 1959), de o precizie superioară, şi balanţele cu fibre de cuarţ care sînt cele mai sensibile. Principiul acestor balanţe este curbarea unei fibre subţiri de sticlă sau de cuarţ sub acţiunea greutăţii; sensibilitatea este foarte mare, putîndu-se obţine o precizie mai mică de 0,1 μg.

Altă tehnică folosită pentru cîntărirea unor cantităţi de micrograme este cea descrisă de Linderström-Lang, care foloseşte un scufundător „cartesian diver", prevăzut cu o mică bulă de aer, pe care se pot aşeza greutăţi mici sau fragmente de ţesut. El se imersează într-o baie şi este foarte sensibil la modificările de presiune ale gazului de deasupra băii de imersiune. Aplicarea acestui principiu la cîntărire este făcută comparînd comportarea scufundătorului pe care s-a pus materialul cunoscut şi apoi înlocuirea acestui material cu greutăţi cunoscute, confecţionate din aur sau, mai bine, din polietilenă mai uşor de manipulat. Obiectul de cîntărit fiind imersat în timpul cîntăririi în apa containerului, face ca această tehnică să fie indicată la cîntărirea celulelor şi ţesuturilor care nu suferă din cauza desicării. Sensibilitatea metodei este mare astfel că s-a putut cîntări şi o singură celulă vie cu o sensibilitate de ±0,01 μg.

În lipsa unor microbalanţe speciale se poate face cîntărirea prin introducerea fragmentului de ţesut într-o soluţie aflată într-un container tarat în prealabil.

Omogenizarea poate fi făcută în diferite moduri în funcţie de scopul urmărit. Astfel, dacă se urmăreşte o determinare a activităţilor enzimatice pe omogenatul total este de dorit o „extracţie" cît mai completă a enzimelor localizate în diferite compartimente celulare. În acest scop se poate folosi omogenizator cu cuţite sau de tip „Ultra-Turrax" şi se lucrează de preferinţă în medii hipotonice pentru a se liza şi membranele organitelor.

Pe omogenat se procedează imediat la determinările enzimatice, deoarece multe enzime sînt instabile chiar dacă omogenatul este păstrat îngheţat: izocitricodehidrogenaza mitocondrială, lacticodehidrogenaza, glucuroniltransferaza. În general, determinările sînt influenţate de un număr mare de factori, cum ar fi, în cazul punctiei bioptice hepatice, mediul de omogenizare, diluţia finală a enzimei, cantitatea de bilă şi sînge din omogenat, conţinutul de lipide etc. Se explică deci datele contradictorii din literatură privind modificările enzimatice din hepatopatii (8).

Mai raţională apare omogenizarea blîndă cu omogenizatoare de tipul Potter-Elvejhem, într-un mediu izotonic în care se păstrează pe cît posibil intacte structurile organitelor celulare. În funcţie de cantitatea de ţesut se folosesc omogenizatoare mai mici sau mai mari. Pentru punctia biopsie este potrivit microomogenizatorul din fig. 24, for-

Scanned with OKEN Scanner

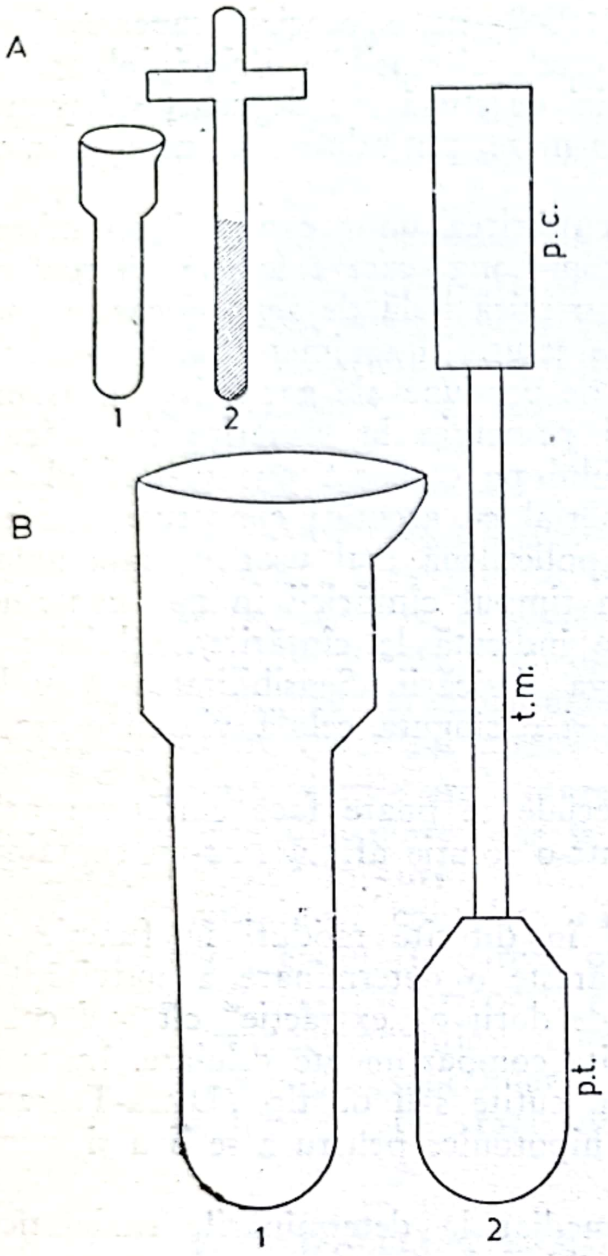


Fig. 24. Diferite tipuri de omogenizatoare. A. Microomogenizator. 1. eprubetă din sticlă rodată; 2. pistil de sticlă rodată. B. Omogenizator de tip Potter-Elvejhem. 1. vas de sticlă; 2. pistil alcătuit dintr-o piesă de teflon (p.t.) pentru strivirea țesutului, tijă metalică (t.m.) și piesă de cauciuc (p.c.) care poate fi adaptată la un motor.

mat dintr-o eprubetă de sticlă rodată și un pistil, de asemenea rodat, care se ajustează exact. Pentru a evita pierderile, omogenizarea nu se face cu un motor, ci manual și în final se aduce omogenatul la diluția dorită.

În continuare se procedează la o fracționare prin centrifugare diferențială, separîndu-se fracțiunea nucleară, apoi cea mitocondrială (cu lizozomi) de supernatantul celular (citoplasmă). Determinările activităților enzimatice se fac pe aceste fracțiuni și bineînțeles că o importanță mai mare au determinările unor enzime localizate în anumite organite („enzimele marker"), ca: fosfataza acidă, beta-glicuronidaza pentru lizozomi, citocromoxidaza pentru mitocondrii etc.

Totuși și acest mod de a lucra prezintă dezavantaje cum ar fi: imposibilitatea obținerii unor fracțiuni absolut pure, prelungirea duratei de preparare care duce la o pierdere semnificativă a activității unor enzime instabile. Apoi, diluția considerabilă în cursul spălării fracțiunilor influențează în grad diferit activitățile diferitelor enzime.

În ceea ce privește determinările enzimatice propriu-zise, de o importanță capitală este alegerea mediului de determinare. Astfel, este interesant faptul că la 5 *min.* după diluarea omogenatului de ficat în mediul de NaCl 0,15 *M*, la o concentrație finală sub 2 *mg* proteină/*ml*, apar modificări mari ale diferitelor enzime, (devieri de —60%—+80% din activitatea teoretică). În albumină 2,5%, aceste

Scanned with OKEN Scanner

modificări sînt mai accentuate (pînă la +140%) şi diferitele activităţi enzimatice se modifică fără vreo corelaţie cu modificările precedente.

Activitatea enzimatică în principiu, trebuie determinată în condiţii optime. Chiar definiţia *U.I.* de activitate enzimatică pretinde aceasta. În practică se întîmpină însă greutăţi aproape de nerezolvat fiindcă condiţiile optime pentru enzima pură diferă total de cele pentru enzimele din ţesuturi în privinţa concentraţiei optime de substrat, coenzime şi cofactori; apoi *pH*-ul şi compoziţia tampoanelor utilizate sînt hotărîtoare pentru valorile determinate. În plus, o greutate mare apare încă din faptul că izoenzimele dintr-un ţesut sau celulă au proprietăţi cinetice diferite, iar distribuţia izoenzimelor este supusă şi ea variaţiilor.

Faţă de această situaţie trebuie ca în fiecare caz particular să se caute condiţiile optime şi să se standardizeze toate determinările. În interpretarea activităţilor enzimatice obţinute pe omogenate, o valoare mai mare o poate avea compararea valorilor relative ale diferitelor enzime decît luarea în considerare doar a valorilor absolute.

6.2.3. | RAPORTAREA ACTIVITĂŢILOR ENZIMATICE

Problema stabilirii unei baze de referinţă a activităţilor enzimatice este pe cît de importantă pe atît de complicată. Baza de referinţă ideală ar fi celula izolată, lucru care este posibil excepţional doar la celulele sanguine, la neuronul izolat şi celulele gliale din jurul acestuia.

1. *Raportarea la greutatea umedă* (a ţesutului imediat după prelevare) este discutabilă datorită modificărilor mari ale ţesuturilor. În condiţii patologice în care o parte din celulele funcţionale sînt înlocuite cu ţesut conjunctiv, au loc proliferări ale vaselor sanguine, canalelor biliare. Chiar şi numărul de celule pe unitatea de greutate poate fi redus (de exemplu umflarea hepatocitelor în condiţii patologice) şi astfel greutatea proaspătă poate indica o activitate scăzută enzimatică, în timp ce conţinutul enzimatic celular nu este modificat.

2. *Raportarea la greutatea uscată* compensează o creştere în conţinutul hidric al celulelor, iar dacă se măsoară greutatea uscată după extracţia lipidelor se elimină şi sursa de eroare provenită din creşterea conţinutului de lipide din celule. Această bază de referinţă este folosită în special în studiile de histochimie cantitativă, cînd secţiunile recoltate în azot lichid sînt secţionate în criostat, deshidratate în vid la —40°C, iar, după cîntărire, într-o cameră lipsită de umiditate, sînt utilizate în determinările microchimice. În general, acest mod de referire este puţin folosit, deoarece nu există suficient ţesut.

Scanned with OKEN Scanner

3) Raportarea la cantitatea de proteine din omogenat sau din fracţiunile subcelulare, aşa-zisele „proteine extractibile", se poate determina prin mai multe metode. Metoda Gornall se bazează pe reacţia biuretului, iar metoda Lowry, care este mult mai sensibilă, determină conţinutul de tirozină şi triptofan. Ea este potrivită îndeosebi pentru ficat, fiindcă în stările patologice creşte cantitatea de lipide (ceea ce duce la imposibilitatea aplicării metodei Gornall din cauza turbidităţii) şi proliferează ţesutul conjunctiv, în care însă tirozina este absentă. În determinările pe fragmentele prelevate prin puncţie-biopsie, metoda Lowry este singura aplicabilă.

După E. Schmidt şi F. W. Schmidt (10) nici această cale nu este absolută fiindcă în stările patologice scade cantitatea de proteine „extractibile", iar, pe de altă parte, conţinutul proteic celular se micşorează ca urmare a reducerii sintezei proteinelor şi a trecerii lor în spaţiul extracelular:

TABEL 4

PROTEINE EXTRACTIBILE DIN FICAT (OMOGENIZATOR POTTER)

Stare clinică	*mg/g ţesut umed*
Martori	84,0±24,6
Hepatită acută	61,2±15,4
Hiperbilirubinemie posthepatitică	86,8±16,0
Hepatită cr. activă	72,4±20,0
Ciroză hepatică	68,8±25,0
Ciroză biliară	54,0±20,0
Colostază intrahepatică	75,3±17,3

Raportarea activităţilor enzimatice/*mg* proteină este totuşi cea mai folosită şi mai raţională, luînd în considerare faptul că majoritatea proteinelor celulare au funcţie enzimatică.

4) Raportarea la cantitatea de ADN ar părea o bază de referinţă bună avînd în vedere constanţa ADN-ului nuclear pentru fiecare specie. Dar, cel puţin pentru ficat, s-a constatat o variaţie de ±7% sub influenţa factorilor metabolici şi hormonali. De asemeni pot exista celule binucleate (în ficat 10—25%), iar pe de altă parte în inflamaţii se produc infiltraţii celulare.

În concluzie, se recomandă raportarea la *mg.* de proteină (determinate prin metoda Lowry în cazul ficatului uman) sau determinarea azotului proteic (valoarea sa înmulţită cu 6,25 ne dă cantitatea de proteine) atunci cînd se dispune de suficient ţesut. Se mai poate determina şi azotul total necolagenic.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul dozărilor unor componente din extractele tisulare, trebuie să se țină seama de diluția datorită deproteinizării precum și de conținutul în apă al țesutului (se poate considera ca fiind 75% pentru ficat, miocard, mușchi, față de 80% în cazul sîngelui).

Să luăm ca exemplu dozarea fructozo-1, 6-difosfatului (FDP) din ficatul de șobolan, folosind sistemul aldolază/triozofosfat izomerază/α-glicerofosfatdehidrogenază (3). Pentru fiecare *mol* de FDP se oxidează 2 *moli* de $NADH_2$. Se realizează un extract din 1 *g.* ficat (greutate umedă) omogenizat în 7,25 *ml* $HClO_4$. Conținutul în apă al ficatului fiind 75%, volumul extractului va fi $7{,}25 + 0{,}75 = 8{,}0$ *ml.* La 6 *ml* din acest extract se adaugă 0,2 *ml* soluție K_2CO_3 pentru neutralizare. După adăugarea carbonatului, extractul are un volum de 6,2 *ml.* Din acesta se ia 1,5 *ml* pentru analiză, ceea ce corespunde la $\frac{6}{6{,}2} \times 1{,}5 = 1{,}45$ *ml* extract acid sau $\frac{1{,}45}{8} = 0{,}181$ *g* țesut omogenizat, factorul de diluție al extractului este deci: $\frac{6{,}2}{6} = 1{,}033$ iar pentru țesut $\frac{1}{0{,}181} = 5{,}51$. Variația extincției, măsurată la 366 *nm* ($\varepsilon_{NADH_2} = 3{,}3 \times 10^6\ mol^{-1} \cdot cm^2$), a fost: $\Delta E = 0{,}065$; volumul final 3 *ml* și s-a lucrat în cuvă de 1 *cm.* Pe baza relației 4.18 avem:

$$c = \frac{0{,}065 \times 3}{10^{-6} \times 3{,}30 \times 10^6 \times 1 \times 1{,}5 \times 2} = 1{,}97 \times 10^{-2}\ \mu moli\ \text{FDP}/ml$$

(Factorul $\frac{3}{1{,}5}$ reprezintă diluția, 10^{-6} factorul de transformare din *moli* în *μmoli*, 1 este drumul apei, iar 2 apare la numitor fiindcă pentru 1 *mol* de FDP se oxidează 2 *moli* de $NADH_2$).

Ținînd cont de factorii de diluție ai extractului și ai țesutului, avem:

$1{,}97 \times 10^{-2} \times 1{,}033 = 2{,}04 \times 10^{-2}\ \mu moli$ FDP/*ml.* extract ac.

și:

$1{,}97 \times 10^{-2} \times 5{,}51 = 0{,}109\ \mu moli$ FDP/*g* țesut umed

sau:

$2{,}04 \times 10^{-2} \times 340 = 6{,}93\ \mu g$ FDP/*ml* extract acid

$0{,}109 \times 340 = 37\ \mu g$ FDP/*g* țesut umed

6.2.4. | DIFICULTĂȚI ÎN DETERMINĂRILE PE ȚESUTURI

Heterogenitatea mediului celular

Într-un fragment recoltat prin puncție-biopsie hepatică, cîntărind 20 *mg* se află cca 4 milioane de celule din care 85% celule parenchi-

Scanned with OKEN Scanner

matoase şi 15% alte tipuri: mezenchimatoase, ale ductului biliar. Pe lîngă acestea mai există vase sanguine şi limfatice. Dacă în ficatul normal profilul enzimatic este dominat de hepatocite, în bolile hepatice proliferează celulele mezenchimale, apar focare de leucocite extravazate, zone de necroză sau celule grăsoase. Cu toate acestea modificările compoziţiei celulare nu afectează într-o proporţie mai mare de 10% profilul enzimatic total, mai puţin în cazul enzimelor specific hepatice, ceva mai mult în cazul enzimelor căilor metabolice majore (care se află în toate celulele) şi mai mult în cazul enzimelor lizozomale care au o activitate mare în histocite şi alte celule capabile de fagocitoză. Astfel, prin compararea bolilor hepatice acute şi cronice cu o infiltraţie inflamatorie a parenchimului asemănătoare, dar cu diferite grade de suferinţă a celulelor parenchimatoase, s-a putut corela modificarea activităţilor enzimatice cu afectarea parenchimului şi nu cu numărul de celule infiltrate.

Diferenţele de distribuţie intralobulară a enzimelor a fost demonstrată pentru ficatul de om şi mamifere prin studii de microdisecţie şi histochimie enzimatică:

TABEL NR. 5

ACTIVITĂŢI ENZIMATICE ÎN DIFERITE PORŢIUNI ALE LOBULUI HEPATIC
(*moli/kg* greut.uscată/oră).

	Zona portală	*Zona mijlocie*	*Zona centrală*
Fosfatază alcalină	0,38±0,02	0,29±0,03	0,19±0,02
G-6-P-dehidrogenaza	1,02±0,06	0,91±0,07	0,77±0,05
Fosfoglucoizomeraza	23,3 ±0,7	19,8 ±0,8	17,8 ±0,6
LDH	137,7±5,7	120,7 ±7,2	76,3 ±3,6
GPT	10,3 ±0,5	7,2 ±0,7	3,7 ±0,4
GOT	50,1 ±1,9	48,8 ±3,4	46,4 ±1,8
MDH	73,1 ±2,8	69,5 ±2,2	67,7 ±2,2
ICDH	10,3 ±0,3	11,7 ±0,3	12,3 ±0,6
Glutamic dehidrogenaza	7,4 ±0,3	7,5 ±0,3	9,8 ±0,3
Proteine (gr/kg greut. uscată)	648 ±19	645 ±18	613 ±14

Influenţa conţinutului de sînge şi bilă

Cantitatea de sînge este mai mare în cazul probelor de autopsie şi materialului intraoperator decît în cazul puncţiilor-biopsie unde reprezintă 1—3% (acul Vin-Silverman) ori 2—4% (acul Menghini). Deşi, după Holzer, această contaminare este neglijabilă ca sursă de activităţi enzimatice (sub 1%), totuşi poate influenţa conţinutul în substrat şi prin aceasta reacţia enzimatică. Această problemă se pune în special în cazul efectuării determinărilor pe omogenatul ţesutului rezultat prin

puncţie-biopsie. În cazul biopsiilor chirurgicale, prin mărunţirea ţesutului cu foarfeca şi spălarea fragmentelor se îndepărtează majoritatea sîngelui, iar elementele figurate sînt îndepărtate la prima centrifugare a omogenatului. La separarea organitelor (mitocondrii) în cursul spălării petelor se îndepărtează şi plasma care ar interfera în determinări.

BIBLIOGRAFIE

Benga, I., Benga, G., Pediatria, 20, 371 1971; Bergmeyer, H. U., *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, GMBH, Weinheim/Bergstr, Academic Press, New York and London, 1965; Boigne, J. M., Boigne, N., Gazethe Med. France, 77, 3811, 1970; Kirk, P. L., *Quantitative ultramicroanalysis*, John Wiley, New York, 1950; Lowry, O. H., in „Methods in Enzymology", vol. IV, edit. S. P. Colowick, N. O. Kaplan Academic Press, New York, 366, 1957; Manta, I., Benga, G., Medicina internă, 25, 277, 1973; Reinouts van Haga, P., De Wael, J., *Ultramicro-Methods*, in „Advances in Clinical Chemistry", vol. IV, Academic Press, New York, 48, 1960; Richterich, R., *Chimie clinique théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

Scanned with OKEN Scanner

METODE DE ANALIZĂ

ANALIZA SÎNGELUI

1. RECOLTAREA SÎNGELUI

Pentru efectuarea determinărilor biochimice sîngele se recoltează de regulă prin puncţie venoasă. În cazul determinărilor ultramicro, ori la determinarea hematocritului, se poate utiliza sînge capilar, recoltat din pulpa degetului.

Este recomandabil ca recoltarea să se facă dimineaţa, pe nemîncate. Totuşi, micul dejun influenţează rezultatul numai la determinarea glicemiei, a lipidelor serice, a aminoacidemiei, a fosforului anorganic, în timp ce restul determinărilor se pot efectua chiar dacă bolnavul a dejunat (excluzînd bineînţeles o masă copioasă).

Folosirea plasmei sau a serului prezintă importanţă în unele cazuri, cum ar fi determinarea unor enzime care se află şi în trombocite şi deci sînt eliberate în cursul coagulării (fosfataza acidă, lactat-dehidrogeneza şi aldolaza). Folosirea serului sau a sîngelui integral se poate face dacă componentul de analizat are aceeaşi concentraţie în eritrocite şi în plasmă (glucoza, azotul ureic).

Serul sau plasma lipemică influenţează determinările fotometrice, mai ales dacă măsurătorile se fac în domeniul 300—500 *nm*. Unii autori recomandă efectuarea unei probe în alb, diluînd cu o soluţie de NaCl 0,9% serul la volumul final al reacţiei de culoare. Acest procedeu nu este corect, fiindcă gradul de turbiditate este modificat în cursul reacţiei de culoare.

Serul sau plasma icterică influenţează prin culoarea proprie măsurătorile în domeniul 400—500 *nm*; se poate face o corecţie prin efectuarea unei probe în alb.

Determinările trebuie efectuate cît mai rapid posibil după recoltarea sîngelui. Dacă aceasta nu este posibil se vor congela serurile (nu se vor păstra la 4°C). Trebuie ţinut cont de această indicaţie specială la determinarea următoarelor componente: glucoza, valorile scad prin păstrarea sîngelui; fosforul anorganic seric creşte (determinarea se va face la cel mult 3 ore de la recoltare); potasiul seric creşte dacă eritrocitele nu sînt separate de ser în decurs de 60 minute de la recoltarea sîngelui; bicarbonatul trebuie determinat în decurs de o oră; *pH*-ul sîngelui creşte în decurs de 4 ore de la 7,4 la 8; dacă sîngele ajunge în contact cu aerul, CO_2 difuzează din eritrocite şi clorul din ser îi ia locul. Deci la determinarea clorului se va evita contactul cu aerul; în

Scanned with OKEN Scanner

privința precauțiilor care trebuie luate la determinarea enzimelor acestea sînt descrise la capitolul de enzime.

Pentru recoltarea plasmei se pot utiliza următoarele anticoagulante redate în Tabelul 6.

TABEL 6

ANTICOAGULANTE FOLOSITE ÎN LABORATORUL CLINIC

Anticoagulantul	*Preparare*	*Potrivit la determinări de :*	*Nu este adecvat pentru determinări de :*
Oxalat de sodiu	300 *mg*/20 *ml* apă bidistilată ; din această soluție se folosesc 0,1 *ml*/2 *ml* sînge. Eventual se evaporă în tuburi, la 37 °C, cantitatea de soluție necesară.	fibrinogen metaboliți	enzime, electroliți, *pH*
Citrat de sodiu	1 parte dintr-o soluție 3,8% de citrat de sodiu + 9 părți sînge.	probe de coagulare, fibrinogen	enzime, electroliți, *pH*
EDTA sodic	300 *mg* sare disodică, dihidratată a EDTA în 20 *ml* apă bidistilată. Din această soluție se folosesc 0,1 *ml* la 2 *ml* sînge.	fibrinogen metaboliți	electroliți, N rezidual
Heparinat de sodiu (potasiu).	60 *mg*/20 *ml* apă bidistilată. Din această soluție se folosesc 0,1 *ml*/2 *ml* sînge.	metaboliți enzime	electroliți
Heparinat de litiu	la fel ca cel de sodiu și potasiu.	metaboliți electroliți	fosfatază alc.
Heparinat de amoniu	la fel ca cel de sodiu și potasiu.	electroliți, metaboliți, amoniac enzime	
Soluție ACD	4,7 *g* acid citric, 16 *g* citrat trisodic, 25 *g* glucoză, se diluează cu apă bidistilată la 1000 *ml*, 1 parte soluție + 4 părți sînge.	enzimele din eritrocite, și plăcuțe,	electroliți, metaboliți

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

2. | PROTEINELE SERICE

Dozarea proteinelor serice se poate face prin mai multe metode. În Tabelul 7 redăm comparativ avantajele și dezavantajele diferitelor tehnici.

Scanned with OKEN Scanner

TABEL 7

TEHNICILE DE DOZARE A PROTEINELOR

	Spectrofotometrie la 210 nm	*Folin (Lowry)*	*Kjeldahl*	*Spectrofotometrie la 280 nm*	*Biuret (Gornall)*
Principiu	Determinarea nr de legături peptidice	Biuret + determinarea tirozinei și a triptofanului.	Precipitare, mineralizare, dozare azot.	Determinarea tirozinei și a triptofanului legate de proteine.	Determinarea nr. de legături peptidice
Sensibilitate	0,5 μg	1 μg	1 μg	10 μg	100 μg
Specificitate pentru proteine	bună	mijlocie	bună	mijlocie	bună
Rezultate falspozitive	—	tirozină, triptofan fenol, ac. uric, ac. PAS	—	tirozină, triptofan ac. uric. xantină	—
Influența naturii proteinei	mică	mare	mică	mare	mică
Tehnica	simplă	exigentă	complicată	simplă	simplă

2.1. | Dozarea proteinelor prin spectrofotometrie la 280 nm.

Principiu. Aminoacizii aromatici (tirozină, triptofan și mai puțin fenilalanina) din moleculele de proteine absorb în ultraviolet. Absorbția depinde de *pH*, la pH 7,5 maximul fiind la 280 *nm*. Coeficienții de extincție depind de tipul de proteine, după cum se vede în tabelul 8,

TABEL 8

COEFICIENȚII DE EXTINCȚIE ÎN PROCENTE (a) A UNOR AMINOACIZI ȘI PROTEINE

Substanța	$a_{210\ nm}$	$a_{280\ nm}$
Glicocol		0
Fenilalanină		0,05
Tirozină		7,96
Triptofan		25,5
Ser uman	205	10,5
Albumină umană	203	5,4
Beta-globulină umană	213	12,9
Fibrinogen uman		16,2
Siderofilină umană	200	14
Ceruloplasmină umană		17,6

Scanned with OKEN Scanner

de aceea rezultatele obţinute nu pot fi decît aproximative. Rezultatul se calculează pe baza coeficientului de extincţie în procente (a). Pentru serul uman s-a calculat, pe baza compoziţiei proteice medii, un coeficient de 10,5.

Aparatură: spectrofotometru, cuve de cuarţ.

Diluant: soluţie de NaCl 0,154 *M* (0,9%).

Tehnică: Se pun 20 *µl* ser într-o cuvă de 1 *cm*, se adaugă 2 *ml* soluţie de NaCl, se agită şi se citeşte extincţia la 280 *nm*, faţă de diluant.

Calcul (a = 10,5):

$$g \text{ prot}/100 \text{ } ml = \frac{E}{a \cdot d} \cdot \frac{\text{volumul final}}{\text{volumul serului}} = \frac{E}{10{,}5 \cdot 1} \cdot \frac{2{,}02}{0{,}02}$$

$$g \text{ proteine } /100 \text{ } ml = E \cdot 9{,}6$$

Observaţii. 1) Metoda nu este specifică pentru protide, fiindcă extincţia este dată de toate substanţele care conţin aminoacizi aromatici. Concentraţia aminoacizilor liberi în ser fiind foarte mică această cauză de eroare este neglijabilă.

2) Determinarea spectrofotometrică în UV la 280 *nm* se pretează bine pentru o orientare rapidă asupra conţinutului proteic. Este metoda de elecţie dacă avem multe probe de analizat, cum este cazul cromatografiei pe coloană.

3) În loc de a calcula rezultatul pe baza coeficientului de extincţie, se poate folosi un standard etalonat prin metoda Kjeldahl sau Gornall, cu concentraţia cunoscută C_S (g%) şi atunci rezultatul se calculează după formula următoare:

$$g \text{ protide}/100 \text{ } ml = \frac{E\text{probă}}{E\text{standard}} \cdot C_S$$

4) Se obţin rezultate identice dacă se practică dozarea pe plasmă.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique théorique et pratique,* Doin, Paris, 1967.

2.2. Dozarea proteinelor prin spectrofotometrie în prezenţă de acizi nucleici (la 260 şi 280 nm)

Metoda se practică numai în cazul extractelor tisulare, unde acizii nucleici interferează în determinarea proteinelor la 280 *nm*, prezentînd o absorbţie proprie la această lungime de undă. Tipic pentru acizii nucleici este o extincţie mai mare la 260 *nm*, faţă de 280 *nm*. Pe această bază se pot determina proteinele în prezenţă de acizi nucleici.

Scanned with OKEN Scanner

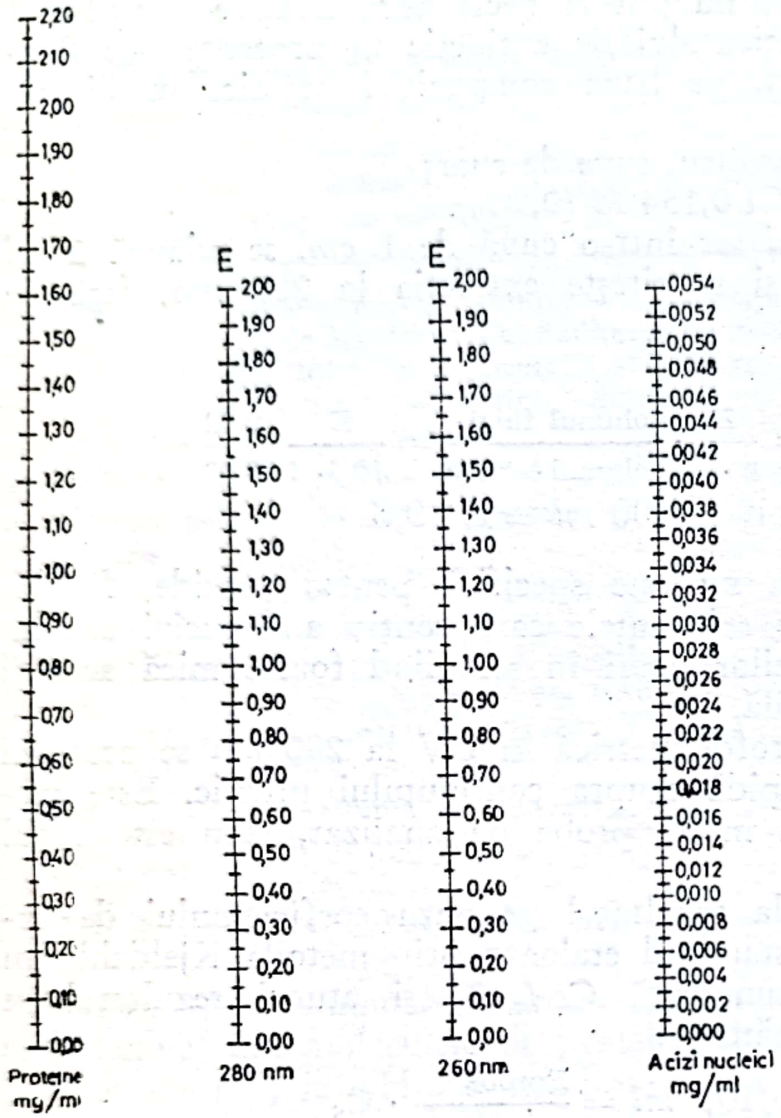


Fig. 25. Nomogramă pentru calculul proteinelor și acizilor nucleici prin spectrofotometrie la 260 și 280 *nm*. Se unesc printr-o dreaptă extincțiile obținute la 260 și 280 *nm*, iar prelungirea acesteia indică concentrațiile.

Principiu. Warburg și Christian au arătat că este posibilă determinarea concentrației proteinelor, plecînd de la extincția probei la 280 și 260 *nm*, pe baza unei formule simple sau a unei nomograme (Fig. 25).

Diluant: soluție NaCl 0,154 *M* (0,9%).

Tehnică. Se măsoară extincția unei diluții a materialului de analizat la 260 și 280 *nm* în comparație cu o soluție de NaCl. Diluția se face în așa fel încît extincțiile să aibă valori de 0,2—0,8.

Calcul: a) după Kalckar:

$$mg \text{ proteină}/ml = (1{,}45 \cdot E_{280}) - (0{,}74 \cdot E_{260})$$

b) după Layne:

$$mg \text{ proteină}/ml = (1{,}55 \cdot E_{280}) - (0{,}76 \cdot E_{260})$$

Observații. Metoda nu este specifică pentru proteine și acizi nucleici și interferează aminoacizii aromatici, bazele purinice, peptidele și nucleotidele; la o concentrație în acizi nucleici peste 20%, eroarea la determinarea proteinelor este foarte mare.

2.3. | Dozarea proteinelor prin spectrofotometrie la 210 nm

Principiu. Determinarea se bazează pe absorbția puternică a luminii ultraviolete la 210 *nm* de către proteină. Măsurarea absorbției la 210 *nm* este potrivită în special pentru proteinele sărace în tirozină și triptofan (aminoacizi care absorb puternic la 280 *nm*).

Reactivi: 1) Soluţie standard albumină serică umană sau bovină 6 g%; 2) Soluţie de NaCl 0,9%.

Tehnică. Se diluează 10 µl ser la 20 *ml* cu soluţie de NaCl 0,9%, în balon cotat. Se determină extincţia la 210 *nm* în cuvă de 1 *cm.* Se calculează concentraţia proteinelor după o curbă etalon construită din soluţia standard de albumină 6 g% din care se fac diluţiile: 1/1000; 1/1500; 1/2000; 1/2500; 1/3000. Se recomandă ca la fiecare serie de determinări pentru verificarea curbei de etalonare să se citească extincţiile soluţiei standard diluată 1/1500 şi 1/3000. În lipsa micropipetelor de 10 µl se poate dilua 25 µl ser la 50 *ml* sau 0,1 *ml* ser la 200 *ml.*

Sensibilitate şi surse de eroare. Determinarea proteinelor prin absorbţie la 210 *nm* este la fel de sensibilă ca şi metoda Lowry. Interferează ionii de acetat, succinat, citrat, ftalat, barbiturat, bicarbonat, alcoolii, soluţia NaOH 0,1 *M,* gramicidina şi insulina.

BIBLIOGRAFIE

Tombs, M. P., Souter, F., McLagan, N. K., Biochem. J., 1969, *73,* 167.

2.4. | Dozarea proteinelor totale prin metoda Lowry

Principiu. Metoda se bazează pe reducerea reactivului fosfomolibdenowolframic (reactivul Folin-Ciocâlteu) de către tirozină şi triptofanul prezent în proteina respectivă.

Reactivi. 1. *Reactivul A:* 4 *g* NaOH pelete, 20 *g* $Na_2CO_3 \cdot 10 H_2O$, 10 *g* $NaKC_4O_6H_4 \cdot 4H_2O$ (tartrat dublu de sodiu şi potasiu — sare Seignette), apă distilată ad 1000 *ml.* 2. *Reactivul B:* 5 *g* $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, apă distilată pînă la 1000 *ml.* 3. *Reactivul C:* amestec de 25 *ml* reactiv A şi 0,5 *ml* reactiv B. 4. *Reactivul D* (fosfomolibdenowolframic): *a*) Soluţie concentrată: 100 *g* wolframat de sodiu ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$), 25 *g* molibdat de sodiu ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$), 700 *ml* apă distilată, 50 *ml* acid fosforic (greutate specifică 1,75), 100 *ml* acid clorhidric concentrat. Soluţia se prepară într-un balon cu fund rotund de 1500 *ml.* Se racordează un refrigerent ascendent cu bule şi se fierbe amestecul timp de 10 ore. După aceea se adaugă 150 g sulfat de litiu, 50 *ml* apă distilată şi cîteva picături de brom pînă cînd se obţine o culoare galben-aurie. Se răceşte balonul şi se diluează soluţia pînă la 1000 *ml.* Această soluţie concentrată este aproximativ 2 *N*; *b*) Soluţia de lucru: 1 *ml* reactiv D se amestecă cu 2 *ml* apă distilată. Se prepară extemporaneu. 5) Soluţie standard albumină (1 *mg*/1 *ml*): 100 *mg* al-

Scanned with OKEN Scanner

bumină serică bovină, apă distilată (+2—3 picături tampon tris 7,6) pînă la 100 *ml*.

Tehnica. Se trasează mai întîi o curbă de etalonare cu albumină serică bovină (10—100 μg).

Soluții	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*M*
albumină serică (μl)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	—
apă bidistilată (μl)	190	180	170	160	150	140	130	120	110	100	200
amestec A+B (*ml*)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
reactiv D (*ml*)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Se agită bine, apoi se lasă în repaus exact 30 minute. Se citește densitatea optică la spectrofotometru în cuva de 2 *cm*, la 660 *nm* față de o probă în alb, lucrată în aceleași condiții, care conține 200 μl apă.

După ce se trasează curba se trece la determinarea proteinelor din ser. Serul se va dilua cu apă bidistilată astfel încît să avem 30—35 μg/probă. Întrucît serul normal are o concentrație de aproximativ 7 g/100 *ml*, este necesară o diluție a serului de 1:20. Determinarea se face ca și în cazul trasării curbei.

Soluții	*Probă*	*Proba în alb*
Ser diluat 1 : 20 (μl)	20	—
Apă distilată (μl)	180	200
Amestec A + B (*ml*)	5	5
Reactiv Folin-Ciocâlteu (*ml*)	0,5	0,5

Se amestecă bine și se lasă exact 30 de minute în repaus la temperatura camerei, după care se citește densitatea optică la 660 *nm*, în cuva de 2 *cm*, față de proba în alb.

Calcul. Dacă E_P = extincția probei vom citi de pe curbă μg de proteină corespunzătoare acestei valori. Să notăm cu G această cantitate:

$$G = \mu g \text{ proteină serică/probă}$$

Ținînd cont de diluția efectuată vom avea:

$$mg \text{ proteină serică/100 } ml \text{ ser} = \frac{20 \times G \times 100}{20} = 100 \cdot G$$

$$g \text{ proteină serică/100 } ml \text{ ser} = \frac{100 \cdot G}{1000} = \frac{G}{10}$$

Scanned with OKEN Scanner

Observaţii. Metoda este superioară metodei biuretului întrucît factorii de turbiditate (cauzaţi de prezenţa lipidelor serice) care interferează sînt în acest caz neglijabili.

BIBLIOGRAFIE

Lowry O. H., Rosenbrough, N. Y., Farr, A., Randall, R. J., J. Biol. Chem., 193, 1951, 265—275.

2.5. | Dozarea proteinelor totale prin metoda Gornall

Principiu. Proteinele şi peptidele dau cu ionul de cupru în soluţie alcalină un complex de culoare violetă, aşa-zisa „reacţie a biuretului". Rezultatele sînt reproductibile şi în acord cu metoda Kjeldahl.

Reactivi. 1. *Reactiv Gornall:* 1,5 *g* $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 6,0 *g* $KNaC_4O_6H_4 \cdot 2H_2O$, (sare Seignette) 300 *ml* NaOH soluţie 10%, apă distilată pînă la 1000 *ml.* 2) *Soluţie standard de proteină* (50 *mg/ml*): 500 *mg* albumină serică bovină, apă distilată (+2—3 picături tampon tris *pH* 7,6) pînă la 10 *ml.*

Tehnica. 1. Se trasează mai întîi o curbă de etalonare conform Tabelului de mai jos:

Soluţii	*Proba în alb*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
Soluţie standard (*µl*)	—	20	40	60	80	100
Apă distilată (*µl*)	500	480	460	440	420	400
Reactiv Gornall (*ml*)	2	2	2	2	2	2
Cantitatea de albumină (*mg*)		1	2	3	4	5

După 15 minute se determină extincţia la 540 *nm* în cuve de 2 *cm* faţă de proba în alb.

După trasarea curbei de etalonare se trece la determinarea proteinelor serice sau plasmatice. Tehnica de lucru este aceeaşi ca pentru curba de etalonare, soluţia standard fiind înlocuită cu ser. Se va lucra conform tabelului de mai jos:

Soluţii	*Probă*	*Proba în alb*
Ser nediluat (*µl*)	50	—
Apă distilată (*µl*)	450	500
Reactiv Gornall (*ml*)	2	2

Scanned with OKEN Scanner

După 15 minute se determină extincţia la 540 *nm* în cuva de 2 *cm* faţă de proba în alb.

Calcul. Dacă notăm cu E_P extincţia probei, vom căuta pe curbă cantitatea de proteină corespunzătoare în *mg*. Notînd această cantitate cu *G* şi ţinînd cont de volumul luat în lucru 50 (*µl*):

$$g \text{ proteină serică/100 } ml \text{ ser} = \frac{G \times 100}{50} = G \times 2 .$$

Observaţie. Cu ajutorul metodei biuretului este posibilă de asemenea determinarea concentraţiei în proteine a precipitatelor obţinute cu acid tricloracetic, cu condiţia ca precipitarea să fie cantitativă. Precipitatul care conţine 2—20 *mg* proteine se solvă în 0,5 *ml* NaOH 3% şi se adaugă 2 *ml* reactiv Gornall. După 15 minute se măsoară extincţia la 540 *nm* în cuva de 2 *cm* faţă de o probă în alb efectuată în aceleaşi condiţii, care însă conţine 0,5 *ml* apă şi 2 *ml* reactiv Gornall. În analiza precipitatelor trebuie să ţinem însă cont de cantităţile însemnate de săruri de amoniu care jenează reacţia biuretului.

BIBLIOGRAFIE

Gornall, A. G., Bardawil, C. J., David, M. M., J. Biol. Chem., *177* (1949), 751.

2.6. | Determinarea albuminei serice cu bromcrezol purpur

Principiu. Prin legarea colorantului cationic bromcrezol purpur (5,5′-dibromo-o-cresolsulfonftaleină) de către albumină, absorbţia la 605 *nm* a acestui complex este mai mare decît a colorantului singur. Diferenţa dintre absorbţia colorantului liber şi probă este proporţională cu cantitatea de albumină din probă.

Reactivi. 1) Sol. standard de bromcrezol purpur 0,01 *M*: într-un balon cotat de 100 *ml* se pun 9,9 *ml* NaOH 0,1 *M*, se adaugă 540 *mg* bromcrezol purpur pur şi se completează la 100 *ml* cu apă. Soluţia este stabilă cîteva luni la 4°C. Colorantul tehnic se va recristaliza: 10 *g* bromcrezol purpur tehnic se dizolvă în eter etilic pentru a forma o soluţie saturată, se adaugă puţin cărbune activ, se filtrează şi se lasă filtratul să cristalizeze peste noapte în frigider. 2) Tampon acetat de Na *pH* 5,6 şi forţă ionică 0,05: într-un balon cotat de 100 *ml* se pipetează 5,6 *ml* acid acetic 1 *M*, 5 *ml* acetat de Na 1 *M* şi apoi se completează la 100 *ml* cu apă. 3) Reactiv de bromcrezol purpur tamponat ($9{,}9 \times 10^{-5}$ *M* în tampon acetat *pH* 5,6 şi forţă ionică 0,05): se adaugă 1 *ml* sol. standard de bromcrezol purpur la 100 *ml* tampon

Scanned with OKEN Scanner

acetat. Este stabilă 24 ore la 4°C. 4) Sol. standard de albumină serică umană 5 g%. 5) Sol. salină fiziologică NaCl 0,9 g%.

Modul de lucru: la 0,01 *ml* ser (= 10 µl) sau 0,02 *ml* (= 20 µl) ser clar, nehemolizat, se adaugă 2 *ml* din reactivul 3. Se prepară o probă în alb din 0,01 *ml* (respectiv 0,02 *ml*) soluţie salină fiziologică şi 2 *ml* colorant (reactiv 3) şi un standard cu 0,01 *ml* (sau 0,02 *ml*) albumină şi 2 *ml* colorant (reactiv 3). Se agită bine tuburile şi se citesc extincţia probei şi a standardului faţă de proba în alb la 605 *nm*. Exticţia nu se modifică timp de cîteva ore la temperatura camerei.

$$Calcul: \frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \times \text{conc} \cdot \text{standard} = g \text{ albumină } \%$$

Observaţii: În cazul serurilor lipemice vizibil, se va face o corecţie a extincţiei probei scăzînd din aceasta extincţia unui martor compus din 0,01 *ml* (0,02 *ml*) ser şi 2 *ml* tampon. În cazul serurilor foarte icterice apare o subestimare a valorii albuminei. Pentru a corecta rezultatul se adaugă la calcul 0,035 g% albumină la fiecare *mg* de bilirubină serică.

Întrucît necesită cantităţi foarte mici de ser, metoda este indicată în special pentru copii şi în leziunile severe cutanate.

În cazul cînd nu se dispune de micropipete (pentru 0,02 *ml* se poate folosi pipeta de hemoglobină) se poate mări proporţional volumul de reacţie (de ex. 0,05 *ml* ser şi 5 *ml* colorant).

BIBLIOGRAFIE

Carter, P., 7th Int. Congr. Clin. Chem., Geneva, Evian, 1969, vol. I. *Methods in Clinical Chemistry*, S. Karger, Basel—München—Paris—New York, 1970, 1—9.
Carter, P., Microchem. Journ., 1970, *15*, 531—539.

2.7. | Teste de disproteinemie

Principiu. Testele de disproteinemie (sau de labilitate coloidală) se bazează pe faptul că la *pH*-ul de 7,4 încărcarea electrică şi stabilitatea coloidală a gamaglobulinelor este mai scăzută decît cea a albuminelor serice. Din acest motiv în urma diluării cu apă distilată a serului şi a adăugării de mici cantităţi de agenţi precipitanţi ai proteinelor se va produce o floculare care va fi cu atît mai exprimată cu cît raportul albumine/globuline va fi mai scăzut.

Metodele utilizate se bazează pe flocularea gama globulinelor în soluţii ionice de mercur (*reacţia Takata—Hobs*) în prezenţa ionilor de zinc (reacţia cu *sulfat de zinc*) sau în prezenţa timolului (*testul de turbiditate Mac Lagan*).

Scanned with OKEN Scanner

Reacţia Takata—Hobs

Principiu. Oxidul mercuric, rezultat din clorura mercurică şi carbonatul de sodiu, formează o soluţie coloidală, a cărei stabilitate este menţinută constantă de albumina serică, ce acţionează ca un coloid de protecţie. Cînd gama globulinele sînt crescute, sau albuminele sînt mult scăzute, în soluţie se produce o floculare a cărei intensitate este proporţională cu cantitatea de gama globuline prezente în ser.

Reactivi. 1) Soluţie carbonat-clorură de sodiu = 20 *g* Na_3CO_3, 7 *g* NaCl ad 1000 *ml* apă distilată; 2) Soluţie clorură mercurică 0,3%.

Tehnica. Într-o eprubetă (160/15 *mm*), se introduc 0,25 *ml* ser nehemolizat şi 5 *ml* din reactivul 1. Imediat se adaugă 1 *ml* soluţie sublimat (2). Se agită eprubeta prin răsturnare (de 2—3 ori) şi după 30 minute se apreciază gradul de floculare.

Interpretare. În serurile normale, nu se produce floculare (eventual apare o slabă opalescenţă).

În serurile cu cantităţi mult crescute de gama globuline, se produce o floculare, imediat după adăugarea sublimatului, care se depune sub formă de precipitat de culoare albă, în mai puţin de 30 minute.

Observaţii. Serurile vechi sau hemolizate dau reacţii fals-negative.

BIBLIOGRAFIE

Comoroşan, S., *Manual de laborator clinic*, Bucureşti, Ed. Medicală, 1962, p. 192

Testul de turbiditate cu timol (Mac Lagan)

Principiu. Diluarea serului cu o soluţie saturată de timol, tamponată la *pH* = 7,8 determină precipitarea unor globuline şi a unor complexe lipoproteice care cresc în ser în caz de alterare a parenchimului hepatic.

Reactivi. Tampon veronal *pH* 7,8: 1,03 *g* veronal sodic, 1,38 *g* veronal, ad 500 *ml* apă bidistilată (se dizolvă prin uşoară încălzire). 2) Soluţie timol 10% în alcool etilic 96°. 3) Reactivul tampon veronal-timol se prepară din amestecarea soluţiei 1 şi 2 în următoarele proporţii: la 50 *ml* tampon barbituric (1) încălzit uşor, se adaugă 0,5 *ml* soluţie timol (2) şi se filtrează. 4) Clorură de bariu cristalizată $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,15 *g* la 100 *ml* apă distilată. 5) Acid sulfuric 0,2 *N*.

Scara etalon cu soluţie standard

Într-un balon cotat de 100 *ml*, se introduc 3 *ml* din soluţia de clorură de bariu (4) şi se completează pînă la semn, cu o soluţie de acid sulfuric (5) (se răceşte balonul sub un curent de apă).

Scanned with OKEN Scanner

Opalescența acestei soluții standard nediluată este echivalentă cu 20 unități turbidimetrice timol (unități Mac Lagan).

Prin diluții succesive din soluția standard, se obține o gamă de 10 etaloane.

Numărul eprubetei	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Soluție standard (*ml*)	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	*ml*
H_2SO_4 0,2*N*	—	1	2	3	4	5	6	7	8	9	*ml*
Unități Mac Lagan	20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	

Eprubetele se închid ermetic (prin înfiolare la flacără) și se pot păstra timp nelimitat. Înainte de întrebuințare, eprubetele sînt omogenizate prin agitare.

O etalonare mai precisă a acestor probe standard se poate obține citindu-se densitatea lor optică la 650 *nm*. Punctul zero se fixează cu reactivul 3. Pentru fotocolorimetre se folosește filtrul roșu.

Se notează pe hîrtie milimetrică valorile densităților optice pe ordonată și valorile corespunzătoare în unități Mac Lagan pe abscisă. Punctele trebuie să cadă pe o dreaptă, ce trece prin origine.

Tehnică. La 0,1 *ml* ser proaspăt, se adaugă 6 *ml* reactiv tampon veronal-timol (3), se agită și se evaluează turbiditatea fie prin comparare vizuală cu turbiditatea din eprubetele scării etalon, fie prin fotometrie la 650 *nm* și interpolarea în curba obținută cu soluțiile standard.

Valori normale: 0-4 unități Mac Lagan.

Interpretare. Valorile cresc în leziuni hepatice, reumatism poliarticular acut, cancer, tuberculoză, malarie, endocardită acută. Servește ca test diferențial între icterul hepatic (reacție pozitivă) și icterul prin obstrucție (reacție negativă). De notat că serurile lipemice dau valori fals crescute.

BIBLIOGRAFIE

Lynch, M. G., Raphael, S. S., Spare, P. D., Inwood, M. J. H. *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology*, 1969, pag. 205.

Reacția cu sulfat de zinc

Principiu. O soluție de sulfat de zinc, precipită serurile care conțin cantități crescute de gama globuline, după principiul amintit anterior.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi. Soluţie tampon Kunkel-sulfat de zinc; într-un balon cotat de 1 *l* se pun 280 *mg* veronal şi 210 *mg* medinal, se adaugă aproximativ 900 *ml* apă distilată şi se agită pînă se dizolvă. Se adaugă 24 *mg* sulfat de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) p.a. şi se agită pînă la dizolvarea completă. Se completează pînă la 1000 *ml*, cu apă distilată. Se controlează *pH*-ul şi se ajustează la *pH* 7,5 cu veronal sau medinal.

Tehnica. La 0,1 *ml* ser se adaugă 6 *ml* soluţie tampon Kunkel-sulfat de zinc, se amestecă uşor, se lasă în repaus 30 minute şi se citeşte extincţia la 470 *nm* faţă de o probă în alb reprezentată de reactivul arătat mai sus.

Calibrarea se poate face cu aceeaşi curbă etalon ca şi în cazul reacţiei timol, iar valorile se obţin prin interpolare.

Valori normale: 2—8 unităţi (la copii se obţin valori mai joase iar la vîrstnici se poate ajunge la 12 unităţi). Valorile crescute indică o creştere a gama globulinelor.

Observaţii. Un procedeu des întîlnit în laboratoarele clinice, care folosesc colorimetrul Pulfrich, constă în citirea valorilor transmisiei în cuve cu secţiunea de 5 *mm*, cu filtrul roşu. Citirea se face pe gradaţiile negre ale tamburului, iar rezultatul se obţine scăzînd din 100 valoarea citită pentru probă. În astfel de condiţii, normalul este de 20—30.

BIBLIOGRAFIE

Lynch, M. G., Raphael, S. S., Spare, P. D., Inwood, M. I. H. Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology, 1969, pag. 205.

2.8. | Electroforeza proteinelor serice

Principiu. Într-o soluţie tampon cu un *pH* 8,6—9, proteinele sînt în stare ionizată, încărcate electronegativ; dacă într-o asemenea soluţie se creează o diferenţă de potenţial între doi electrozi dispuşi la o anumită distanţă, moleculele proteinelor se îndreaptă spre polul pozitiv (catod). Viteza de migrare depinde mai ales de mărimea particulelor (moleculelor) şi de sarcina lor electrică.

Pentru separarea proteinelor din diferite lichide biologice, se efectuează electroforeza pe hîrtie, în agar, agaroză, folii de acetat de celuloză sau gel de poliacrilamidă. Prin electroforeză pe gel de amidon sau de poliacrilamidă, se obţin separări avansate. În laboratorul clinic este încă uzuală separarea pe hîrtie. Există însă tendinţa ca această metodă să fie înlocuită cu procedeul mai expeditiv al electroforezei pe folii de acetat de celuloză.

Scanned with OKEN Scanner

2.8.1. | ELECTROFOREZA PE HÎRTIE DE FILTRU

Redăm condiţiile de lucru pentru electroforeza proteinelor serice pe hîrtie de filtru, cu aparatul Carl Zeiss—Jena. Acelaşi procedeu se aplică în principiu şi pentru aparate confecţionate cu mijloace proprii sau furnizate de alte firme.

Aparatura. Cameră umedă de migrare, sursă de curent continuu (redresor) şi dispozitiv pentru fotometrare (integrator ERI_{10}).

Reactivi. 1) Soluţie tampon $pH = 9$ avînd forţa ionică $\mu = 0{,}06$; 6,69 *g* veronal sodic; 3,51 *g* acetat de sodiu cristalizat cu 3 molecule de apă, se dizolvă în 1000 *ml* apă distilată; 2) Soluţie de colorant Amidoschwartz 10 B: 10 *g* Amidoschwartz 10 B se aşază pe o pîlnie de sticlă, pe hîrtie de filtru şi se spală colorantul cu 1000 *ml* soluţie de acid acetic glacial 10%, în metanol. Soluţia care se filtrează conţine colorantul dizolvat şi relativ purificat. 3) Acid acetic glacial 100 *ml*, alcool metilic 400 *ml*, apă distilată 500 *ml*. 4) Acid acetic glacial 100 *ml*, apă distilată 900 *ml*. 5) Hîrtie Whatmann nr. 1, tăiată în benzi (30/3 *cm*).

Tehnica. Banda de hîrtie se îmbibă cu tampon şi excesul de soluţie se îndepărtează prin tamponarea benzii între două hîrtii de filtru. Benzile de hîrtie se introduc apoi în camera umedă şi se lasă sub tensiune electrică aproximativ 30 minute. Se întrerupe curentul electric şi se aplică serurile pe benzi sub formă de linie dreaptă, lăsînd la extremităţile hîrtiei 2—3 *mm* spaţiu liber. Pentru hîrtie lată de 3 *cm*, se aplică 6—8 *µl* ser, cu o pipetă de hemoglobulină, la o distanţă de 3,5—4 *cm* de la suportul hîrtiei dinspre polul negativ. Pipeta se fixează la mijlocul hîrtiei şi apoi se întinde serul prin mişcări rectilinii. Cînd se face evaluarea fotometrică, liniile curbe cauzează erori mari.

Se lasă soluţia de proteină pe banda de hîrtie 5—10 minute şi apoi se stabileşte legătura cu curentul electric. Timpul necesar separării fracţiunilor pe hîrtia de dimensiunile amintite, este de 17 ore, calculînd 0,5 *mA*/bandă. Prin tatonări şi modificări de amperaj şi tensiune, se poate scurta timpul de separare. Tehnica de lucru este identică şi pentru alte lichide biologice.

După migrarea proteinelor şi a separării pe francţiuni, benzile se scot din camera umedă, se lasă la temperatura camerei pentru îndepărtarea excesului de tampon şi se introduc apoi în etuvă la 80—100°C timp de 10 minute, pentru coagularea (fixarea) proteinelor.

Observaţii. 1) Se inversează sensul migrării după fiecare separare.

2) Nu se lucrează şi nu se execută nici o operaţie în camera umedă decît după întreruperea curentului electric.

Scanned with OKEN Scanner

Colorarea benzilor se realizează în cuve de sticlă, plastic sau porţelan, în care se pune soluţia de Amidoschwartz 10 B amestecînd mereu benzile timp de 10—20 minute.

Benzile colorate se trec succesiv prin soluţiile de decolorare (reactiv 3) şi (Reactiv 4) pînă cînd ultima soluţie de spălare este incoloră. Soluţiile de decolorare se recuperează prin filtrare pe cărbune activ. Pe porţiunea fără proteine, hîrtia trebuie să aibă culoarea albastru deschis. Spre deosebire de alţi coloranţi colorantul Amidoschwartz 10 B se pare că dă o coloraţie mai intensă, mai puţin variată şi este uniform fixat pe fracţiunile proteice. Benzile se usucă la temperatura camerei.

Evaluarea fracţiunilor proteice se realizează prin intermediul integratoarelor (fotometrie prin transparenţă). Tehnica de lucru este trecută în prospectul aparatului. În principiu banda de hîrtie colorată se deplasează prin faţa unei fante înguste în dreptul unui fotocolorimetru astfel încît extincţiile se înscriu pe ordonată, iar pe abscisă, distanţa. Se obţine o diagramă care poate fi descompusă prin extrapolări în curbe Gauss (fig. 26). Suprafaţa curbelor este direct proporţională cu concentraţia fracţiunilor proteice.

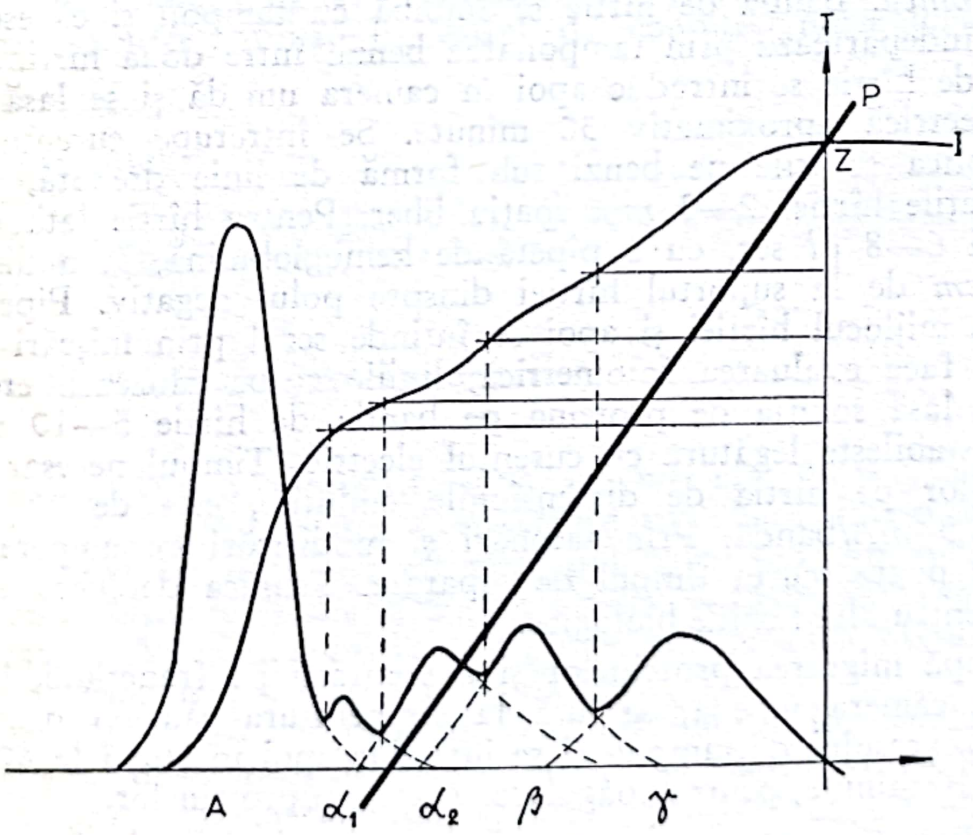


Fig. 26. Curba obţinută prin densitometria unei foreograme cu ajutorul integratorului Zeiss ERI 10. Albumine = 55%, $\alpha_1 = 4\%$; $\alpha_2 = 9{,}5\%$; $\beta = 11{,}5\%$; $\gamma = 21\%$.

După integrare, se calculează valorile procentuale ale fracţiunilor electroforetice. În acest scop se prelungesc curbele Gauss şi din intersecţiile lor se ridică perpendiculare pe abscisă, care întretaie linia de integrare, notată în figura dată cu I. Din punctul de intersecţie al ramurii descendente a curbei Gauss a gama globulinelor cu abscisa (sfîrşitul gama globulinelor) se ridică o perpendiculară pe abscisă notată cu T. Din punctul de intersecţie al liniei de integrare I cu perpendiculara T, notat în figură cu Z, se coboară o linie dreaptă pe abscisă, care să asigure lungimea de 10 *cm*, notată în figură cu P.

Din punctele demarcate pe linia de integrare I, se duc paralele cu abscisa, pe dreapta P, şi distanţele, exprimate în *mm*, de pe această linie reprezintă valoarea procentuală a fracţiunilor, în ordinea normală a migrării electroforetice: albumine, α_1, α_2, β, şi γ globuline.

Observaţii. Evaluarea corectă necesită ca distanţa de la abscisă la punctul Z (măsurată pe perpendiculara T) să nu fie mai mare ca 10 *cm* sau mai mică de 5 *cm*.

Pentru valori normale şi interpretare vezi pag. 130—132 şi Fig. 27.

Electroforeza proteinelor urinare se efectuează în acelaşi mod, dar în cele mai multe cazuri este necesară o prealabilă concentrare a urinei de aproximativ 50 de ori. În acest scop 5 *ml* din urina filtrată se introduc într-un sac de dializă (celofan) închis la un capăt şi spălat cu apă distilată. Se leagă apoi sacul de dializă imediat deasupra nivelului urinei şi se suspendă într-un pahar Berzelius de 600—1000 *ml* fixîndu-l de o baghetă de sticlă, aşezată deasupra paharului. Se toarnă apoi în pahar zaharoză (zahăr obişnuit) pînă cînd sacul este acoperit, şi se lasă peste noapte la +4°C. A doua zi se scoate sacul, se spală cu apă distilată suprafaţa sa exterioară şi se usucă cu hîrtie de filtru. Se desface apoi sacul şi se scoate urina concentrată, cu ajutorul unei pipete Pasteur.

2.8.2. ELECTROFOREZA PE ACETAT DE CELULOZĂ

Redăm procedeul recomandat de firma „Millipore" care furnizează echipamentul şi reactivii necesari.

Aparatură. Cameră umedă, redresor şi dispozitiv de fotometrare (densitometru) adaptat pentru folii de acetat de celuloză.

Reactivi. 1) Tampon barbiturat *pH* 8,6, tărie ionică 0,075. Se dizolvă 0,331 *g* veronal şi 1,848 *g* medinal în apă distilată şi se aduce volumul la 120 *ml*. 2) Amestec de colorant şi fixator. Se dizolvă în 1000 *ml* apă distilată 0,9 *g* colorant Ponceau S, 13,4 *g* acid tricloracetic şi 13,4 *g* acid sulfosalicilic. 3) Acid acetic 5%. 4) Folii de acetat de celuloză. 5) Soluţie pentru transparentizare: se amestecă 70 *ml* acid

Scanned with OKEN Scanner

acetic glacial cu 30 *ml* acetat de etil. Se prepară zilnic înainte de utilizare.

Tehnica. Se umplu cuvele aparatului cu tampon barbituric. Se scot foliile de acetat de celuloză din cutie şi se notează. Se imersează foliile de acetat de celuloză în tampon, pe timp de 15 minute, avîndu-se grijă să nu se prindă bule de aer în mediul de acetat de celuloză. Se scot foliile din tampon şi se sugativează excesul de lichid şi se plasează apoi în camera umedă între cele două cuve avînd grijă ca cele două capete ale membranei de acetat de celuloză să fie imersate în tampon. Se aplică apoi 0,25 *µl* din serul de analizat cu ajutorul unui dispozitiv special furnizat de firmă. Se dă drumul la curentul electric pentru obţinerea separării electroforetice (100 volţi timp de 20 minute). Se întrerupe curentul şi se scot membranele de acetat de celuloză care se imersează apoi în amestecul de colorant şi fixator pe timp de 10 minute. Se scot apoi din baia de colorant, se lasă să se scurgă excesul de colorant şi se spală în trei băi succesive de acid acetic 5% (fiecare spălare durează 2 minute). Se sugativează excesul de lichid şi se lasă să se usuce la temperatura camerei (sau la 60°C). Se imersează încet foliile în alcool etilic pe timp de 5 minute şi se trec apoi în soluţia de transparentizare (reactiv 5) unde rămîn doar un minut. Se lasă să se usuce la 40—60°C şi se fotometrează.

Observaţii. Metoda este extrem de precisă şi rapidă, putînd furniza rezultate în decurs de o oră. Detaliile privind tehnica depind de aparatura accesibilă.

BIBLIOGRAFIE

Scherr, G. H., Tr. N. Y. Acad. Sci., 23 (1961) 519.
Clinical Electrophoresis System. Application Manual AM 301 *Millipore* Corp. Bedford, MA, 1972.

2.8.3. ELECTROFOREZA ÎN GEL DE AMIDON SAU ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ

Aceste metode sînt utilizate doar în scop de cercetare şi ne vom limita la indicaţiile bibliografice:

Smithies, O., *Advances in Protein Chemistry,* Academic Press, New York—London, 1959, pp. 65—113.
Maurer, H. R., *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrilamide Gel Electrophoresis,* Walther de Gruyter, Berlin—New York, 1971.

Scanned with OKEN Scanner

2.9. | Glicoproteinele serice

2.9.1. | DETERMINAREA FRACŢIUNII SEROMUCOIDICE (METODA VARAY—MASSON).

Principiu. Determinarea seromucoizilor se bazează pe faptul că această fracţiune a glicoproteinelor este solubilă în acid percloric fiind insolubilă în acid fosfowolframic.

Reactivi. 1) Acid percloric 6%. 2) Acid fosfowolframic 5% în HCl 2 *N*. 3) Soluţia NaOH 0,4 *N*. 4) Reactiv biuret. Se dizolvă 1 *g* $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ în 100 *ml* apă distilată; separat se dizolvă 3 *g* sare Seignette (tartrat dublu de sodiu şi potasiu) în 50 *ml* apă distilată. Se amestecă cele două soluţii, se adaugă 6 *g* NaOH şi 0,20 *g* KI. Se aduce la 200 *ml* cu apă distilată. 5) Soluţie etalon de caseină 1 *mg/ml* în NaOH 0,4 *N*. Se păstrează 7—10 zile la +4°C.

Tehnica. Se amestecă 2 *ml* ser cu 4 *ml* acid percloric (reactiv 1) şi se agită. Se filtrează printr-o hîrtie de filtru densă (de ex. Whatmann nr. 50). Se aşteaptă cel puţin o oră pentru a se colecta tot filtratul care trebuie să fie perfect clar. Se adaugă filtratului 0,8 *ml* acid fosfowolframic (reactiv 2). Se aşteaptă 10 minute şi se centrifughează la 2000 r.p.m., timp de 10 minute. Se îndepărtează supernatantul prin sifonare avînd grijă să nu se piardă precipitatul conţinînd seromucoizi. Precipitatul se spală cu 2 *ml* acid fosfowolframic; se centrifughează şi se îndepărtează supernatantul. Precipitatul se solvă în 2 *ml* NaOH 0,1 *N*. Se efectuează o probă în alb (2 *ml* NaOH 0,4 *N*) şi o probă etalon conţinînd 2 *ml* soluţie de caseină (reactiv 5). În fiecare din cele 3 eprubete se adaugă 0,8 *ml* reactiv biuret (4) ţinîndu-se probele timp de 60 minute la întuneric pentru dezvoltarea reacţiei de culoare. Se citeşte extincţia la 540 *nm* faţă de proba în alb.

Calcul

$$\text{seromucoizi } mg/100\ ml = \frac{E \text{ probei}}{E \text{ etalonului}} \times 100$$

Valorile normale ale seromucoizilor oscilează între 40 şi 75 *mg/100 ml*, exprimate ca proteine.

Dozarea seromucoizilor perclorosolubili poate fi făcută şi pe baza conţinutului lor în hexoze (normal 11—13 *mg/ 100 ml*).

BIBLIOGRAFIE

Varay, A. şi Masson M., Presse Médicale 1960, nr. 34, p. 1323.

Scanned with OKEN Scanner

2.9.2. | DETERMINAREA HEXOZELOR LEGATE DE PROTEINE

Principiul. Metoda se bazează pe dozarea hidraţilor de carbon legaţi de proteinele precipitate din ser cu alcool sau acid tricloracetic. Prin deshidratare cu acid sulfuric hexozele produc derivaţi de furfurol care dau o reacţie de culoare cu orcinolul.

Reactivi. 1) Etanol 95%; 2) NaOH 0,1 *N;* 3) Acid sulfuric p.a. 60% (60 vol. SO_4H_2 conc. + 40 vol. H_2O); 4) orcinol 1,6% (1,6 g orcinol recristalizat din benzen se solvă în 100 *ml* H_2O). Se păstrează la +4°C; 5) Reactiv orcinol-acid sulfuric. Se prepară proaspăt prin amestecarea a 7,5 *ml* acid sulfuric 60% (reactiv 3) cu 1 *ml* soluţie orcinol (reactiv 4); 6) Standard de galactoză-manoză 0,2 *mg/ml* (Se dizolvă 10 *mg* galactoză şi 10 *mg* manoză în 100 *ml* H_2O). Se păstrează la +4°C.

Tehnica. La 0,1 *ml* ser se adaugă 5 *ml* etanol 95% amestecîndu-se. Se centrifughează, se îndepărtează supernatantul iar precipitatul se spală cu încă 5 *ml* alcool 95%. Proteinele precipitate şi spălate se solvă în 1 *ml* NaOH. Se prepară o probă în alb (1 *ml* H_2O) şi o probă standard (1 *ml* din soluţia de galactoză-manoză 0,2 *mg/ml*). Se adaugă în fiecare eprubetă 8,5 *ml* reactiv orcinol acid sulfuric (reactiv 5) şi se amestecă bine. Eprubetele se încălzesc apoi pe baia de apă la 80°C timp de 15 minute. Se răcesc eprubetele la un jet de apă de robinet şi se citesc extincţiile, faţă de proba în alb, la 540 *nm.*

Calcul:

$$\text{Hexoze legat de proteine } mg/100\ ml = \frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 200$$

Valori normale: 120 ± 3 *mg* la 100 *ml* ser.

BIBLIOGRAFIE

Winzler, R. J., *Determination of Serum Glycoproteins,* in Glick, D., (Editor), *Methods of Biochemical Analysis,* vol. III, Interscience New York—London, 1961, pag. 289.

2.9.3. | DETERMINAREA ACIDULUI SIALIC (NEURAMINIC)

Principiu. Acidul sialic produce o reacţie de culoare cu difenilamina.

Reactivi. 1) Acid tricloracetic 5%; 2) Amestec acid (90 *ml* acid acetic glacial şi 10 *ml* acid sulfuric concentrat); 3) Reactiv difenil-

Scanned with OKEN Scanner

amină (1 *g* difenilamină recristalizat din etanol se solvă în 90 *ml* acid acetic glacial şi 10 *ml* acid sulfuric concentrat). 4) Standard de glicoproteină conţinînd 0,2 *mg* acid sialic/*ml*. (De ex. soluţia de orosomucoid 1,79 *mg*/*ml* corespunde la 0,2 *mg* acid sialic/*ml*).

Tehnica. Se adaugă încet 4,8 *ml* acid tricloracetic 5% (reactiv 1) la 0,2 *ml* ser, respectiv la 0,2 *ml* standard orosomucoid. Ambele eprubete se trec apoi pe o baie de apă la fierbere unde se ţin timp de 15 minute, prevenindu-se evaporarea prin acoperirea eprubetelor cu foiţe de staniol. Se răcesc eprubetele şi se filtrează. Se iau 2 *ml* de filtrat din probă, respectiv din standard şi se amestecă cu 4 *ml* soluţie difenilamină (reactiv 3). Se efectuează probe de corecţie, în care 2 *ml* de filtrat din probă, respectiv din standard, se amestecă cu 4 *ml* amestec acid (reactiv 2). Se efectuează o probă în alb (2 *ml* acid tricloracetic + 4 *ml* reactiv difenilamină). Se fierbe pe baia de apă 30 minute. Se răcesc. Se citesc extincţiile la 530 *nm* faţă de proba în alb (ac. tricloracetic + reactiv difenilamină).

Calcul

$$mg \text{ acid sialic}/100\ ml \text{ ser} = \frac{\text{E probei} - \text{E de corecţie a probei}}{\text{E standard} - \text{E de corecţie pentru standard}} \times \times 0{,}2 \times 100$$

Valori normale: 60 ± 3 *mg* acid sialic/100 *ml* ser.

2.9.4. | ELECTROFOREZA GLICOPROTEINELOR SERICE

Are o aplicabilitate redusă în laboratorul clinic. Pentru detalii privind tehnica indicăm ca bibliografie: Moga, A., Cucuianu, M. Stud. cerc. Med. Int. 5(1965) 493.

2.9.5. | INTERPRETAREA MODIFICĂRII GLICOPROTEINELOR SERICE (SEROMUCOIZI, HEXOZE LEGATE DE PROTEINE, ACID SIALIC)

Majoritatea proteinelor serice conţin hidraţi de carbon în structura lor putînd fi deci considerate ca glicoproteine. Un conţinut mai bogat în hidraţi de carbon se constată însă în cazul unor α_1 şi α_2 globuline.

Creşterea glicoproteinelor şi în special a fracţiunilor seromucoidice survine în procesele inflamatorii şi în distrucţiile de ţesuturi. Valori deosebit de crescute se observă în reumatismul acut, colagenoze

Scanned with OKEN Scanner

și neoplazii. Aceste creșteri coincid de regulă cu un nivel crescut al fibrinogenului plasmatic, cu o creștere a α_1 și α_2 globulinelor în proteinogramă și cu o accelerare a VSH.

Scăderea seromucoizilor se observă în afecțiunile hepatice grave.

BIBLIOGRAFIE

Winzler, R. J., *Determination of Serum Glycoproteins in Glick, D.*, (Editor), *Methods of Biochemical Analysis*, vol. II, Interscience, New York—London, 1961, p. 289.

2.10. | Interpretarea modificărilor proteinelor plasmatice

Valoarea diagnostică a determinării proteinelor plasmatice totale este limitată. În medie proteinele plasmatice sînt de 7 g/100 *ml* (6,5—7,5 g/100 *ml*).

Hipoproteinemii (adică scăderi ale proteinelor totale sub 6 g/100 *ml*) se pot întîlni în sindromul nefrotic, în denutriția gravă, fenomene de malabsorbție și unele ciroze hepatice.

Hiperproteinemii (respectiv creșteri ale proteinelor totale peste 8 g/100 *ml*) se constată în inflamații cronice, colagenoze, leucemii și în special în hiperimunoglobulinemiile neoplazice (mielom multiplu, macroglobulinemie Waldenström). De notat că modificări ale concentrației proteinelor plasmatice pot surveni în caz de hiperhidratare sau dezhidratare, producînd hipo sau hiperproteinemii aparente. Urmărirea concentrației proteinelor totale are deci valoare pentru urmărirea terapiei de corecție hidroelectrolitică în serviciile de reanimare.

Modificarea raportului între diferitele fracțiuni proteice (disproteinemiile) are o importanță diagnostică mult mai mare.

Scăderea albuminelor survine de regulă în toate disproteinemiile, fiind însă mai accentuată în cauzul unui deficit în aportul de proteine, sindrom de malabsorbție, în deficitul de sinteză (ciroză hepatică) sau în pierderi de proteine (sindrom nefrotic, arsuri).

Creșterea alfa$_1$ și alfa$_2$ globulinelor se însoțește de regulă de o creștere a fibrinogenului și a glicoproteinelor și de o accelerare a VSH-ului. Aceste modificări survin de obicei în caz de inflamație acută, distrucții tisulare, neoplasm și colagenoze. O creștere marcată a alfa$_2$ globulinelor se întîlnește și în sindromul nefrotic.

Modificările beta globulinelor au o importanță diagnostică mai redusă, dar creșterea gama globulinelor indică prezența unei inflamații cronice sau sugerează o proliferare reactivă sau tumorală a imunocitelor producătoare de imunoglobuline. Scăderea gama globulinelor

Scanned with OKEN Scanner

survine în sindromul nefrotic, malnutriţie şi are uneori un caracter familial.

Modificările electroforetice cele mai caracteristice realizează aşa zisele tipuri de disproteinemie pe care le prezentăm în fig. 27.

Aşa cum reiese din Fig. 27 *inflamaţia acută* se caracterizează prin creşterea alfa$_1$ şi alfa$_2$ globulinelor şi coincide cu o accelerare accentuată a VSH-ului; *inflamaţia cronică* se caracterizează prin creşterea gama globulinelor care are un caracter difuz. De notat că în endocardita bacteriană creşterea gama globulinelor este foarte marcată în timp ce în endocardita reumatică recidivantă cresc alfa$_2$ globulinele.

Pierderea de proteine pe cale renală realizează un aspect tipic cu scăderea marcată a albuminelor şi scăderea moderată a gama globulinelor, în timp ce alfa$_2$ şi beta globulinele cresc.

Pierderea enterală de proteine evoluează cu scăderea albuminelor şi creşterea procentuală a celorlalte fracţiuni.

Ciroza hepatică este caracterizată prin scăderea albuminelor şi creşterea marcată a gama globulinelor.

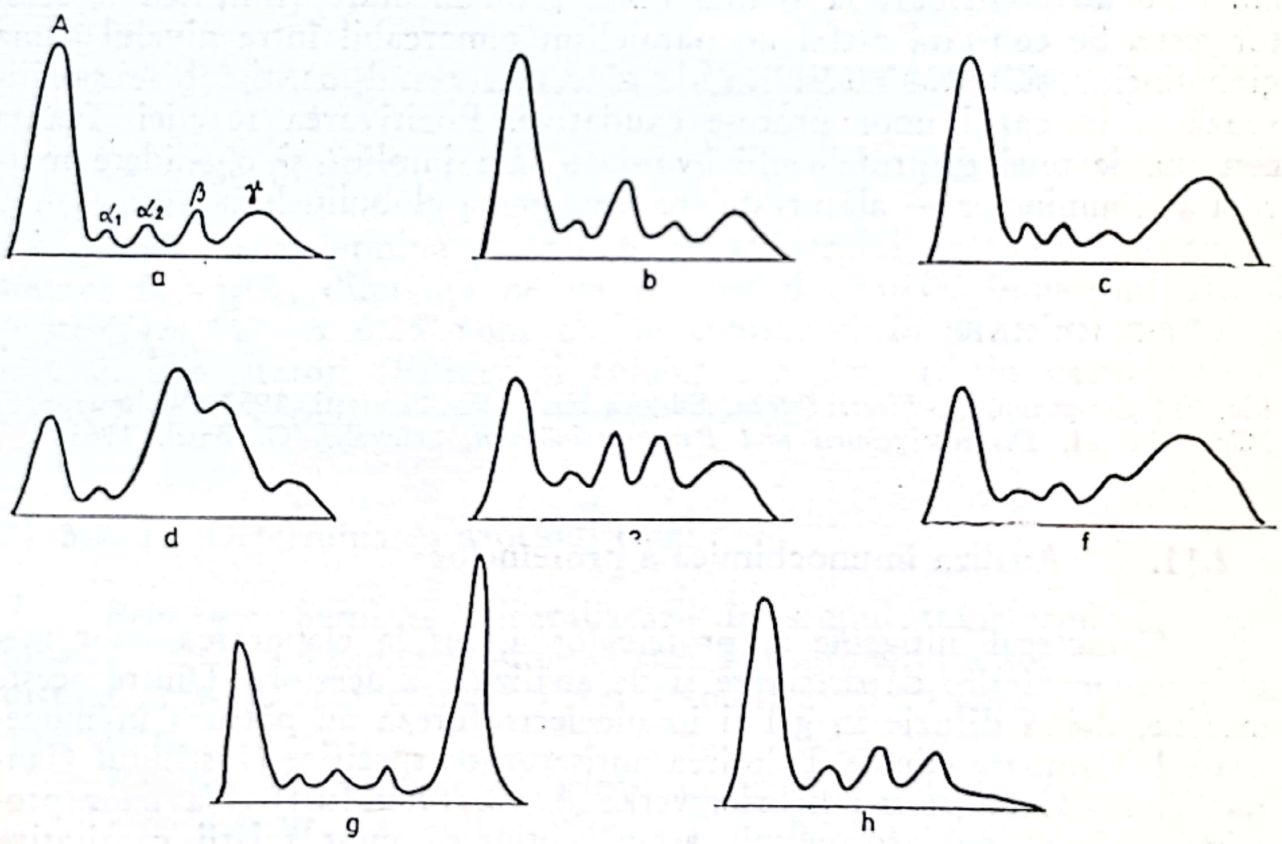


Fig. 27. Tipuri de disproteinemie: a) normal; b) inflamaţie acută; c) inflamaţie cronică; d) sindrom nefrotic; e) enteropatie exudativă; f) ciroză hepatică; g) mielom multiplu; h) hipogamaglobulinemie. Valorile normale ale fracţiunilor electroforetice sînt de 53—59% pentru albumine, 3—5% pentru globulinele alfa$_1$, 8—10% pentru globulinele alfa$_2$, 11—13% pentru beta globuline şi 15—19% pentru beta globuline.

Mielomul multiplu evoluează cu o creştere de tip particular a fracţiunii gama. Spre deosebire de aspectul întîlnit în creşterile reactive ale gama globulinelor (inflamaţia cronică, ciroză) în mielom creşterea gama globulinelor e omogenă (bandă îngustă şi intensă care la fotometrare realizează un pisc ascuţit).

Hipogamaglobulinemia este uşor de recunoscut.

Separarea electroforetică în gel de poliacrilamidă sau în gel de amidon este superioară, dar semnificaţia clinică a subfracţiunilor izolate cu aceste metode este încă în curs de studiere. De asemenea subfracţionarea avansată a proteinelor plasmatice se poate obţine prin metode imunologice. Importanţa acestor metode constă mai ales în posibilitatea de a se detecta lipsa unor proteine plasmatice (în aşa-zisele disproteinemii prin defect: lipsa ceruloplasminei, lipsa alfa$_1$antitripsinei, lipsa siderofilinei etc.).

Testele de labilitate coloidală a serului sînt depăşite la ora actuală de metodele electroforetice. Datorită simplităţii lor, ele nu şi-au pierdut însă utilitatea în laboratoarele mai mici, mai ales că metodele moderne au contribuit la o mai bună fundamentare ştiinţifică a acestor teste. Se constată astfel un paralelism remarcabil între nivelul gama globulinelor şi testul cu sulfat de zinc, iar testul cu timol se pozitivează şi în cazul unor procese exudative. Pozitivarea reacţiei Takata corespunde unei disproteinemii avansate care implică şi o scădere marcată a albuminelor — alături de creşterea gama globulinelor.

BIBLIOGRAFIE

Idu, M., Cîmpeanu, S., *Electroforeza*, Editura medicală, Bucureşti, 1957; Wuhrmann, F., Märki, H. H. *Disproteinemien und Paraproteinämien*, Schwabe, G. Basel, 1963.

2.11. Analiza imunochimică a proteínelor

Caracterul antigenic al proteinelor a dus la elaborarea unor metode imunochimice de detectare şi de analizare a acestora. Dintre aceste metode, dubla difuzie în gel şi imunoelectroforeza au pătruns în numeroase laboratoare clinice. Folosirea antiserurilor specifice (Institutul Cantacuzino—Bucureşti sau Behringwerke A. G. Frankfurt) şi a unor proteine antigen standard permit astăzi obţinerea unor relaţii cantitative asupra unor proteine a căror dozare diferenţiată nu este încă posibilă cu metoda chimice (imunoglobuline, IgA, IgG, IgM, alfa$_2$ macroglobulina, alfa$_1$ fetoproteina, diversele haptoglobine, diversele componente ale complementului etc.). Subliniem faptul că aplicabilitatea diagnos-

Scanned with OKEN Scanner

tică a acestor metode este limitată şi că o interpretare corectă a datelor obţinute se face doar după o practică mai îndelungată în laboratoare cu profil de imunochimie. Din acest motiv ne limităm în a indica bibliografie celor interesaţi.

BIBLIOGRAFIE

Gheţie, V., Micuşan, V., *Analiza imunochimică. Teorie şi practică,* Ed. acad. R.S.R., Bucureşti, 1966. Darcy, D. A., *Imunology,* 3, 1960, 225. Frei, P. C. În *Methods in Clinical Chemistry,* Karger, Basel, 124, 1970, 130. Uriel, J. în Grabar, P., Burtin, P. (editori), *Immunoelectrophoretic Analysis,* Elsevier, Amsterdam, 1964, 30—57. Lohmann, D., Zimmermann, S. în *Klinisch-chemische Labormetoden,* VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1969. Onodera, S. Tohoku, J. Exp. Med., 89, 1966, 279. Iammarino, R. M., Clin. Biochem., 2, 1969, 447—453. Kroll, J., Jensen, K. A., Lyngbye, J., Congr. clinic. Chem Geneva/Evian, vol. I, 1969, 131—139. Lamrence, M., Amer. J. Med. Technol., 30, 1964, 209—221. Jordan, W. C., White, W., Amer. J. Med. Technol., 31, 1965, 1969—174. Franklin, E. C., Lowenstein, I, Bigelow, B., Meltzer, M., Amer. J. Med., 37, 1964, 332.

3. | DOZAREA SUBSTANŢELOR AZOTATE SERICE

Pe lîngă proteine, serul conţine şi alte substanţe azotate, a căror azot poartă numele de azot restant.

Dacă se determină azotul total al serului în *mg*% şi azotul restant în *mg*%, diferenţa ne va da azotul proteic. Înmulţind azotul proteic (*mg*%) cu 6,25 vom obţine conţinutul în proteine (*mg*%) a serului. Unii autori (Prunty şi colab.) consideră că în cazul serului, factorul de multiplicare este 6,54 în loc de 6,25.

3.1. | Determinarea azotului total

Principiu. Serul se mineralizează în scopul transformării azotului din diferite substanţe azotate pe care le conţine, în amoniac, care este distilat într-un aparat micro-Pregl (modificat de Parnas—Wagner) şi apoi titrat.

Reactivi. 1) Amestec de selenit de mercur plus sulfat acid de K (selenit de mercur 1 *g*, sulfat acid de potasiu topit şi pulverizat 24 *g*).

Selenitul de mercur se prepară prin dublă descompunere între acetatul mercuric (soluţie saturată) şi selenit de sodiu: 3,2 *g* acetat mercuric se solvă într-o cantitate minimă de apă, se adaugă apoi o soluţie apoasă de 2,62 *g* selenit de sodiu puriss ($Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$). Precipitatul produs se culege pe un filtru Büchner mic, se spală bine

Scanned with OKEN Scanner

cu apă bidistilată și se usucă în etuvă la 100° sau în exicator, în vid, pe acid sulfuric. Se pulverizează și se păstrează bine închis.

Notă. Metoda cu selenit este, după noi, preferabilă altora. Se poate folosi însă și amestecul dat de Sörensen și Andersen: sulfat de cupru pro anal. ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), sulfat neutru de potasiu pro anal. (K_2SO_4), oxid mercuric (HgO) în părți egale. Oxidul de mercur se prepară, precipitînd o sare de mercur (acetat mercuric) cu o soluție de NaOH 10%. Precipitatul este spălat bine cu apă bidistilată și uscat în exicator, în vid, pe H_2SO_4 concentrat. Din acest amestec se iau 20 *mg* pentru 1 *ml* amestec acid sulfuric — acid fosforic.

2) Amestec acid sulfuric — acid fosforic. Se amestecă un volum acid sulfuric concentrat „pro anal" (d = 1,84) cu un volum acid fosforic concentrat puriss (d = 1,7). Se păstrează într-un flacon bine închis cu dop șlefuit.

3) Indicator Polonowski. Într-un mojar se triturează 0,1 g roșu de metil, cu 7,4 *ml* NaOH 0,05 *N*. Lichidul se trece într-un balon și se încălzește pe baia de apă, pînă la completa disolvare a colorantului. După răcire, lichidul se transvazează într-un balon gradat de 500 *ml*. Se adaugă 25 *ml* albastru de metilen 0,5 g% (soluție apoasă). Se completează pînă la semn cu apă. Se păstrează bine închis. 4) Soluție NaOH 0,01 *N*. 5) Soluție H_2SO_4 0,01 *N;* 6) Soluție de NaOH 40% cu 1% tiosulfat de sodiu: NaOH pelete 40 g, $Na_2S_2O_3$ 1 g și apă distilată pînă la 100 *ml*.

Tehnica. Pentru o mai mare precizie se recomandă efectuarea analizei în două probe paralele.

1) *Mineralizarea.* În 2 baloane Kjeldahl de 10 *ml* se introduc cîte 0,2 *ml* ser, 1 *ml* amestec acid sulfuric — acid fosforic, 10 *mg* selenit de mercur și 1—2 perle de sticlă. Paralel, într-un balonaș asemănător, se introduc numai 1 *ml* amestec acid sulfuric — acid fosforic, 10 *mg* selenit de mercur și 1—2 perle de sticlă (proba martor). Balonașele se încălzesc cu microbecuri, la fierbere înceată. La început lichidul devine brun, apoi incolor. Se continuă încălzirea încă cîteva minute. Mineralizarea se termină în cca 20 minute.

2) *Distilarea.* Se întrebuințează aparatul micro-Pregl, modificat de Parnas—Wagner (fig. 28).

În balonul generator de vapori *B* se pune apă distilată și cîteva picături de acid sulfuric. De asemenea cîteva bucăți de piatră ponce. Se aduce apa la fierbere, clema (*a*) fiind închisă, iar clema (*c*) deschisă. Între timp, în Erlenmeyerul (*E*) se introduc 10 *ml* de acid sulfuric 0,01 *N* și 2 picături de indicator Polonowski. Balonul Erlen-

Scanned with OKEN Scanner

meyer se așază sub refrigerentul (*f*) în așa fel încît vîrful acestuia pătrunde puțin în lichid.

Conținutul balonașului, în care s-a făcut mineralizarea se varsă prin pîlnia (*h*) în distilatorul (*K*). Balonașul se spală apoi de 2—3 ori cu cîteva picături de apă, care se varsă tot prin pîlnia (*h*). În felul acesta asigurăm o transvazare cantitativă. Se toarnă apoi prin pîlnia (*h*) 7—8 *ml* de soluție de NaOH 40% care conține 1% tiosulfat de sodiu. Se închid clemele (*g*, *c* și *e*) și se deschide clema (*a*). Amoniacul care distilă este prins în soluția de acid sulfuric 0,01 *N* din balonul (*E*). După 5 minute, refrigerentul (*f*) se ridică din lichid, se spală cu cîteva picături de apă și se continuă distilarea încă 1—2 minute, pentru ca tot lichidul rămas pe refrigerent să cadă în balonul (*E*).

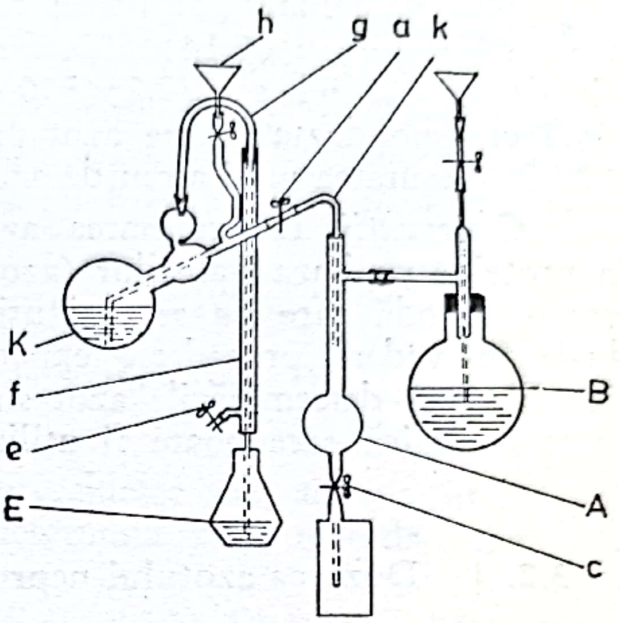


Fig. 28. Aparatul Parnas-Wagner (descrierea părților componente și modul de lucru sînt trecute în text).

3. Spălarea aparatului. Distilarea fiind terminată, se înlătură flacăra care a servit la încălzirea balonului *B*, generator de vapori. În acest fel se va produce vid în aparat și conținutul din balonul de distilare (*K*) va fi aspirat prin tubul (*K*) în tubul (*A*), de unde va fi eliminat prin deschiderea clemei (*c*). Prin pîlnia (*h*) se introduc 10—15 *ml* de apă. Se încălzește cîteva minute balonul (*B*), se înlătură apoi flacăra, se produce aspirația prin tubul (*K*). Operația de spălare se repetă de cîteva ori, după care aparatul poate fi întrebuințat pentru o nouă determinare.

4. Titrarea. Vasul (*E*), conținînd cei 10 *ml* H_2SO_4, în care s-a captat amoniacul, se scoate de sub refrigerentul (*f*) înainte de a începe spălarea aparatului. Excesul de acid sulfuric 0,01 *N*, care nu a reacționat cu amoniacul, se titrează cu o soluție NaOH 0,01 *N*, cu ajutorul unei microbiurete. Soluția de hidroxid trebuie ajustată exact cu cea de acid.

Calcul. Cunoscîndu-se volumul (*V*) de H_2SO_4 0,01 *N* din balonul în care se captează amoniacul distilat și volumele de NaOH 0,01 *N* folosite pentru titrarea probei de analizat (*T*) și a probei martor (*B*), se poate afla numărul de mililitri de H_2SO_4 0,01 *N* (*n*) neutralizați de amoniacul distilat din proba de analizat.

$n = (V - T) - (V - B)$ în cazul de mai sus $n = (10 - T) - (10 - B)$

Din valoarea n se poate calcula apoi azotul după formula: *mg* azot/100 *ml* = $n \times 0{,}14 \times 500$. Se înmulţeşte cu 500 deoarece s-a pornit de la 0,2 *ml* ser ($0{,}2 \times 500 = 100$ *ml* ser). Factorul 0,14 reprezintă corespondenţa în *mg* azot pentru 1 *ml* dintr-o soluţie de amoniac 0,01 *N* (greutatea unui atom de azot fiind 14).

Observaţii. Determinarea azotului total şi calcularea conţinutului în proteine pe baza valorilor (azotului total — azot neproteic) × 6,25 este o metodă care nu se mai utilizează în laboratoarele clinice, avîndu-se în vedere procedeele expeditive expuse anterior (vezi cap. 2). Dat fiind că determinările azot sînt de o mare precizie am redat totuşi această tehnică care poate fi utilizată ca o metodă de referinţă.

3.2. | Dozarea azotului neproteic

Sub acest nume se înţelege azotul care se poate determina în sînge (plasmă, ser) după precipitarea proteinelor. Valoarea azotului neproteic (N restant) variază după cum ne referim la sînge, ser sau plasmă şi după natura dezalbuminatului. Azotul restant reprezintă azotul următoarelor substanţe: uree, amoniac, aminoacizii, acid uric, creatinină şi creatină, indican, glutamine, azot nedeterminat.

Unii autori francezi au introdus şi noţiunea de azot rezidual. Azotul rezidual este dat de diferenţa: azot restant — azot ureic.

3.2.1. | DEPROTEINIZAREA CU ACID TRICLORACETIC

Principiu: Se efectuează deproteinizarea serului cu acid tricloracetic, filtratul este mineralizat şi amoniacul determinat prin metoda Parnas-Wagner (micro-Kjeldahl). Polipeptidele nu precipită cu această metodă.

Reactivi. 1) Acid tricloracetic 20%: acid tricloracetic 20 g, apă distilată pînă la 100 *ml*; 2) Toţi reactivii prevăzuţi pentru dozarea azotului total (pct. 3.1.).

Tehnica. Într-o eprubetă se introduc 2 *ml* ser, 2 *ml* acid tricloracetic 20% şi se amestecă bine cu o baghetă de sticlă. Se filtrează printr-un filtru cantitativ (fără cenuşe).

Într-un balonaş Kjaldahl se introduc 0,5 *ml* filtrat (corespunzător la 0,25 *ml* ser), 1 *ml* amestec în volume egale de acid sulfuric pro anal. şi fosforic pur, 10 *mg* amestec sulfat de potasiu şi selenit de Hg. Conţinutul balonaşului se mineralizează în condiţiile prevăzute la azotul total. De asemenea şi celelalte operaţiuni: distilarea amoniacului, captarea lui în soluţie 0,01 *N* de acid sulfuric şi titrarea excesului de

Scanned with OKEN Scanner

acid cu NaOH 0,01 *N* se execută întocmai ca la determinarea azotului total. Amoniacul se captează însă în 5 *ml* H_2SO_4 0,01 *N*.

Calculul se face după același principiu ca și în cazul azotului total. Avîndu-se în vedere că s-a lucrat cu 0,5 *ml* filtrat, corespunzător la 0,25 *ml* ser și că amoniacul degajat a fost captat în 5 *ml* H_2SO_4 0,01 *N*; $n = (5—T) — (5—B)$

$$mg \text{ azot neproteic/100 } ml \text{ ser} = n \times 0{,}14 \times 400$$

3.2.2. | DEPROTEINIZAREA CU ACID WOLFRAMIC ȘI ACID SULFURIC

Principiu. După precipitarea proteinelor cu acid wolframic și acid sulfuric, azotul din filtrat se determină prin metoda microKjeldahl. Polipeptidele sînt parțial precipitate.

Reactivi. 1) Wolframat de sodiu soluție 10%: $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ 10 g, apă distilată pînă la 100 *ml*; 2) Acid sulfuric 0,085 *N*: H_2SO_4 *N*, 8,0 *ml*, apă distilată pînă la 88 *ml*; 3) Toți reactivii prevăzuți pentru dozarea azotului total (pct. 3.1).

Tehnica. 1. Într-o eprubetă se pipetează ser sau plasmă 2,0 *ml*, H_2SO_4 0,085 *N* 16,0 *ml*, wolframat de sodiu 2,0 *ml*. Se fierbe puțin. După răcire amestecul se filtrează prin hîrtie Whatman nr. 1. Se pipetează 10 *ml* din filtratul liber de proteine (corespunzător la 1 *ml* ser) într-un balon de mineralizare Kjeldahl și se procedează la fel ca pentru azotul total (mineralizare, distilare cu captarea amoniacului în 10 *ml* H_2SO_4 0,01 *N* și titrarea cu NaOH 0,01 *N*.

Calcul. $n = (10 - T) - (10 - B)$;

$$mg \text{ azot neproteic/100 } ml = n \times 0{,}14 \times 1000$$

Valori normale 10 — 30 *mg*/100 *ml* ser și 20—40 *mg*/100 *ml* sînge.

Azotul neproteic crește în insuficiența renală.

3.2.3. | DOZAREA AZOTULUI POLIPEPTIDIC

Principiu. Acidul tricloracetic precipită numai proteinele serice, pe cînd acidul fosfowolframic precipită și polipeptidele. Din același ser se iau două probe și se tratează una cu acid tricloracetic, iar cealaltă cu acid fosfowolframic. Se determină azotul din fiecare filtrat. Diferența dintre cele două valori reprezintă azotul polipeptidic.

Reactivi. 1) Soluție de acid tricloracetic 20%; 2) Soluție fosfowolframat de sodiu 10%; 3) Acid sulfuric 0,58 *N*; 4) Toți reactivii necesari pentru dozarea azotului total (pct. 3.1).

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica

1) Deproteinizarea serului. Proba A: 5 *ml* ser + 5 *ml* acid tricloracetic 20%. Proba B: 5 *ml* ser + 10 *ml* apă bidistilată + 5 *ml* fosfowolframat de sodiu 10% plus 5 *ml* H_2SO_4 0,58 *N*. Probele A şi B se prepară în dublu exemplar. După amestecarea cu o baghetă subţire a conţinutului celor 4 eprubete se filtrează prin hîrtie de filtru cantitativă (fără cenuşe).

2) Mineralizarea. În balonaşe micro-Kjeldahl se introduc: a) 1 *ml* filtrat A, 1 *ml* amestec acid sulfuric-acid fosforic şi 10 *mg* amestec selenit de mercur-sulfat acid de potasiu.
b) 2 *ml* filtrat B, 1 *ml* amestec acid sulfuric-acid fosforic şi 10 *mg* amestec selenit de mercur-sulfat acid de potasiu. Se vor folosi doar seruri proaspete.

În total se pregătesc 6 balonaşe: 2 cu probe A şi 2 cu probe B şi 2 martori (doar reactivi fără ser). Mineralizarea, distilarea şi titrarea se fac după tehnica descrisă la azotul total. Amoniacul se prinde însă în 5 *ml* H_2SO_4 0,01 *N*. După titrare se face media aritmetică a celor două probe A şi a celor două probe B.

Calcul. Se obţin valorile *n* în probele A şi B după formula

$n = (5 - T) - (5 - B)$

mg azot/100 *ml* în proba A = $nA \times 0.14 \times 200$

mg azot/100 *ml* în proba B = $nB \times 0{,}14 \times 250$

mg azot polipeptidic/100 *ml* = *mg* azot/100 *ml* proba A — *mg* azot/100 *ml* Proba B.

Valori normale: 4—6 *mg*/100 *ml*.

BIBLIOGRAFIE PENTRU DOZĂRILE DE AZOT ÎN SER

Manta, I., Ciplea, Al., *Metodele laboratorului clinic*, Cartea Românească, Cluj, 1947.
Prunty, F. T. G., McSeiney, R. P., Hawkins, V. B., *A Laboratory Manual of Chemical Pathology*, Pergamon Press, Lo don—New York—Paris—Los Angeles, 1950.

3.2.4. | DOZAREA COLORIMETRICĂ A AZOTULUI NEPROTEIC

Principiu. După precipitarea proteinelor serice substanţele azotate din supernatant sînt transformate în sulfat de amoniu prin incinerare cu acid sulfuric, iar amoniacul format se determină pe baza reacţiei de culoare pe care o dă cu reactivul Nessler.

Reactivi. 1) Acid tricloracetic 20%; 2) Acid sulfuric 40% (v/v): se prepară turnîndu-se cu grijă 40 *ml* acid sulfuric concentrat peste 60 *ml* apă bidistilată. 3) Soluţie apă oxigenată 30% (Perhydrol p.a. conţinînd 30% H_2O_2); 4) NaOH 20%; 5) Reactiv Nessler cu o compoziţie particulară: 10 *g* iodură mercurică (HgI_2) şi 8 *g* iodură de po-

Scanned with OKEN Scanner

tasiu (KI) se dizolvă în 10 *ml* apă bidistilată peste care se toarnă o soluţie conţinînd 20 g NaOH in 90 *ml* apă bidistilată. Se lasă să stea pînă la clarifiere sau se centrifughează şi se decantează supernatantul într-o sticlă brună; 6) Standard de azot amoniacal. Se dizolvă 1,8865 g sulfat de amoniu uscat şi pur în 1000 *ml* apă bidistilată. Soluţia va conţine 40 *mg* azot amoniacal/100 *ml*.

Tehnica. Se amestecă 0,5 *ml* ser cu 2 *ml* acid tricloracetic 20% şi se centrifughează. În paralel se prepară o probă în alb (0,5 *ml* apă bidistilată + 2 *ml* acid tricloracetic) şi o probă standard (0,5 *ml* soluţie standard + 2 *ml* acid tricloracetic). Se iau apoi cîte 0,5 *ml* din supernatantul clar al probei şi respectiv 0,5 *ml* din standard şi din proba în alb (tratate în acelaş mod ca şi proba) şi se trec în cîte o eprubetă de sticlă Jena marcată la 10 *ml*. Se adaugă 3 picături acid sulfuric (reactiv 2), 2 picături apă oxigenată (reactiv 4) şi se încălzesc eprubetele la o flacără mică pînă la apariţia vaporilor de acid sulfuric. Din acest moment se continuă încălzirea încă 2 minute la o flacără şi mai mică (care nu mai atinge eprubeta). După răcire se adaugă în fiecare eprubetă 1—3 *ml* apă bidistilată şi 0,5 *ml* hidroxid de sodiu 20% răcindu-se în continuare. Se aduc apoi volumele la 10 *ml* cu apă bidistilată şi se amestecă bine. Se scot 5 *ml* din acest amestec (din probă, standard şi respectiv proba în alb) şi se trec în alte eprubete la care se adaugă 0,25 *ml* reactiv Nessler şi se amestecă bine. După 3—6 minute se citesc extincţiile probei şi standardului la 430 *nm* faţă de proba în alb în cuva de 1 *cm*.

Calcul

$$\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 40 = mg \text{ azot neproteic/100 } ml \text{ ser}$$

Valori normale: 20—40 *mg*/100 *ml* ser.

Observaţii. În locul reactivului Nessler se poate folosi reacţia Berthelot (vezi dozarea ureei). În acest scop după incinerare şi răcire se aduce volumul în eprubete la 10 *ml* cu apă bidistilată. Se scot apoi cîte 1 *ml* din probă, standard şi proba în alb şi se trec în alte eprubete la care se adaugă pe rînd 0,5 *ml* NaOH 20%, 1 *ml* reactiv fenolic şi 1 *ml* hipoclorit (ultimii doi reactivi sînt descrişi la dozarea ureei). După 15 minute se diluează cu acelaşi număr de mililitri apă bidistilată proba, standardul şi proba în alb pentru a aduce coloraţia albastră la o intensitate convenabilă şi se citesc extincţiile la 630 *nm* faţă de proba în alb. Calculul se face ca mai sus.

Reacţia Berthelot poate înlocui dealtfel reactivul Nessler în orice dozare de azot amoniacal (dozări de uree după scindarea acesteia de

către urează, dozări de amoniac în sînge şi urină; dozări ale amoniacului produs din citrulină de către ornitin carbamiltransferază etc.).

Deproteinizarea poate fi efectuată nu numai cu acid tricloracetic dar şi cu wolframat de sodiu şi acid sulfuric iar incinerarea poate fi efectuată şi cu amestec de incinerare cu selenit sau amestec Sörensen (sulfat de cupru şi sulfat de potasiu) şi bineînţeles acid sulfuric.

Metodele colorimetrice de dozare a azotului neproteic sînt mult mai expeditive decît laboriosul procedeu Parnas-Wagner care necesită distilarea amoniacului, captarea lui în acid şi retitrarea excesului de acid. Dată fiind însă precizia acestor metode clasice, ele nu au doar o valoare istorică şi mai sînt încă utilizate ca metode de referinţă în laboratoare care fac cercetări în domeniul substanţelor azotate.

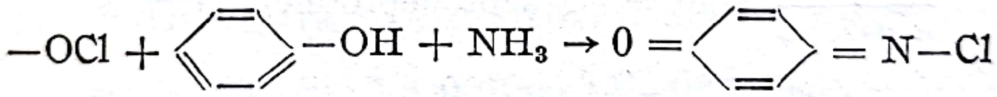
BIBLIOGRAFIE

Iendrassik, L., Polgár, A., Biochem. Z., 305, 1940, 237. Stegemann, H., Loeschke, V., Z. Physiol. Chem., 329, 1962, 241.

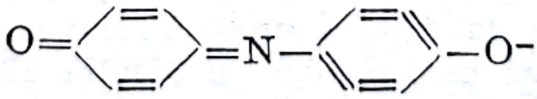
3.3. | Dozarea azotului ureic din ser

3.3.1. | METODA CU UREAZĂ

Principiu. Ureea din ser este hidrolizată sub acţiunea unei enzime specifice, ureaza, şi se descompune în amoniac şi bioxid de carbon. Amoniacul eliberat este determinat apoi pe baza reacţiei pe care o dă cu fenolul şi hipocloritul de sodiu în mediu alcalin. (Reacţia Berthelot).



parachinoncloroimina formată astfel, reacţionează cu o altă moleculă de fenol pentru a forma indofenol care dezvoltă în mediu alcalin o intensă culoare albastră.



Reacţia este catalizată de nitroprusiatul de sodiu.

Reactivi. 1) Urează tamponată: se dizolvă 1 g EDTA în 80 *ml* apă bidistilată (deionizată) şi se ajustează *pH*-ul la 6.5 cu NaOH diluat. Se adaugă apoi 150 *mg* urează şi se completează volumul la 100 *ml* cu apă bidistilată. Se agită bine într-un vas de plastic şi se păstrează într-un astfel de vas la +4°C. Stabilitatea în astfel de condiţii este de aproximativ o lună. În lipsa unei ureaze comerciale de

Scanned with OKEN Scanner

bună calitate se poate folosi cu rezultate bune făina de soia obținută prin măcinarea boabelor de fasole soia. Făina de soia (100 *g*) se suspendă în 500 *ml* apă distilată, agitîndu-se bine timp de 30 minute. Se lasă apoi la temperatura camerei 2 ore agitîndu-se din cînd în cînd. Se centrifughează, iar din supernatant se precipită ureaza cu acetonă (10 volume acetonă la un volum supernatant). Precipitatul se spală cu acetonă pe o pîlnie Büchner la vid. Pulberea uscată care se obține conține urează și se folosește în proporție de 500—800 *mg* pentru 100 *ml* soluție EDTA 1% *pH*=6.5. *2) Soluție etalon de uree:* 40 *mg* uree pură, uscată în prealabil în exicator, se dizolvă în apă bidistilată aducîndu-se volumele la 100 *ml* și adăugîndu-se cîteva picături de cloroform pentru conservare. Se păstrează în frigider în sticlă bine închisă. *3) Reactiv fenolic.* Se dizolvă 25 *g* fenol chimic pur în 400 *ml* apă bidistilată. Separat se dizolvă 125 *mg* nitroprusiat de sodiu în 50 *ml* apă distilată. Se amestecă cele două soluții și se aduce volumul la 500 *ml*. Se păstrează în sticlă brună la +4°C. timp de două luni. *4) Reactiv hipoclorit.* Într-un balon de 500 *ml* se dizolvă 12,5 *g* NaOH în 400 *ml* apă bidistilată. Se adaugă apoi un volum de hipoclorit comercial conținînd 1,10 *g* hipoclorit de sodiu (de regulă 20 *ml* soluție). Se aduce volumul la 500 *ml* și se păstrează în sticlă brună la +4°C. Stabilitatea este similară cu cea a soluției de fenol. În lipsa unei surse de hipoclorit comercial se poate prepara o astfel de soluție în laborator, barbotîndu-se clor activ într-o soluție de NaOH 1%. Clorul activ se obține într-un balon Würtz de 250 *ml* în care se așază 30—50 *g* permanganat de potasiu ($KMnO_4$). La orificiul superior al balonului Würtz se fixează, prin dop de cauciuc, o pîlnie de separație în care se introduce acid clorhidric concentrat. Tubul lateral al balonului Würtz este conectat cu un tub de sticlă care pătrunde în soluția de NaOH 1%. Prin deschiderea robinetului pîlniei de separare, HCl va picura peste $KMnO_4$ iar clorul degajat trece prin tubul lateral în soluția de NaOH formîndu-se astfel hipocloritul de sodiu. Pentru 1000 *ml* NaOH 1% e nevoie de o barbotare de 30—60 minute.

Titrarea soluției stoc de hipoclorit astfel obținută se face iodometric. Pentru aceasta într-un flacon Erlenmeyer se așază 1 *ml* soluție stoc de hipoclorit, 10—15 *ml* apă bidistilată, 2 *ml* HCl conc. și 2—3 *g* KI cristale. Se titrează cu tiosulfat de sodiu ($Na_2S_2O_3$) 0,1 *N* pînă la o culoare galben deschis. Se adaugă 2—3 picături de amidon 1% și se continuă titrarea pînă la dispariția culorii albastre. Ținîndu-se cont de bazele iodometriei și de faptul că greutatea moleculară a hipocloritului de sodiu este 74,5 se poate calcula conținutul de hipoclorit al soluției după formula:

$$\text{Hipoclorit } g\% = 0 \cdot 745 \times \text{N } ml\ Na_2S_2O_3\ 0 \cdot 1\ N \times \text{Factorul tiosulfat}$$

Scanned with OKEN Scanner

Soluția de hipoclorit de sodiu folosită pentru determinări de uree se obține diluîndu-se soluția stoc, așa cum s-a arătat mai sus, astfel încît să conțină 1,1 g hipoclorit la 500 *ml* NaOH 2,5%.

Tehnica. Se pipetează 0,2 *ml* suspensie urează într-o serie de eprubete. Se adaugă apoi cu o pipetă de hemoglobină cîte 0,02 *ml* ser în probele de analizat, 0,02 *ml* apă distilată pentru proba în alb și 0,02 *ml* soluție de uree 40 *mg*% pentru proba standard. Se incubează eprubetele la 37°C pe baia de apă timp de 15 minute. Se scot eprubetele de la incubat și se adaugă *1* ml reactiv fenolic (3), se agită ușor și se adaugă 1 *ml* reactiv hipoclorit alcalin (4). Se incubează din nou la 37°C timp de 15 minute pentru dezvoltarea reacției de culoare. Se scot din baie eprubetele și se diluează prin adăugarea a 10 *ml* apă distilată (vezi observații). Se amestecă continuu eprubetele și se citește extincția la 630 *nm* față de proba în alb.

$$\textit{Calcul.}\ \text{Uree}\ mg\% = \frac{E\ \text{probei}}{E\ \text{standardului}} \times 40$$

Valori normale sînt între 20—40 *mg* uree/100 *ml* ser (sau 10—20 *mg* azot ureic). Transformarea ureei în azot ureic se face ținîndu-se cont că ureea $CO(NH_2)_2$ are o greutate moleculară de 60 și conține 2 atomi de azot fiecare avînd o greutate de 14.

$$\text{Deci azot ureic}\ mg/100\ ml = \frac{\text{Uree}\ mg/100\ ml \times 28}{60} = \frac{\text{Uree}\ mg/100\ ml}{2{,}14}$$

Valori mai scăzute se constată în graviditate. Creșteri pînă la 50 *mg*/100 *ml* se pot constata la subiecți sănătoși care au depășit vîrsta de 60 ani. Creșteri marcate sînt caracteristice pentru insuficiența renală.

Observații. Culoarea albastră este stabilă timp de mai multe ore. Cantitatea de apă distilată folosită pentru diluarea complexului colorat depinde de sensibilitatea spectrofotometrului utilizat. Valori corecte se obțin pentru citiri ale extincției între 0,2 și 0,8. Dacă reacția de culoare este prea intensă se vor dilua în aceeași proporție probele de analizat și proba în alb, ținîndu-se cont de diluție la calcul. Dacă datele clinice sugerează posibilitatea unei azotemii este recomandabil ca analiza să fie efectuată în duplicat, în una din probe serul fiind diluat 1/5 cu ser fiziologic.

Ureaza se inactivează în prezența metalelor grele iar soluția de EDTA protejează ureaza prin efectul său chelator.

Vaporii de amoniac din laborator pot falsifica reacția.

BIBLIOGRAFIE

Chaney, A. I. and Marbach, E. P., Clin. Chem., 8, 1962, p. 130.

Scanned with OKEN Scanner

Principiu. Ureea, în mediu alcalin, sub acţiunea hipobromitului de sodiu sau potasiu, pune în libertate azot molecular. Volumul de azot degajat este proporţional cu cantitatea de uree intrată în reacţie şi se determină gazometric.

$$CO(NH_2)_2 + 3NaOBr + 2NaOH \rightarrow N_2 + Na_2CO_3 + 3NaBr + 3H_2O$$

Bioxidul de carbon degajat este absorbit în soluţia alcalină.

Ureometrul Kowarsky (fig. 29) constă dintr-un tub în formă de „U" împărţit prin 2 robinete în 3 părţi. Robinetul superior are un singur canal, cel de jos are 3 căi. Sub robinetul superior tubul se îngustează pe o porţiune şi este divizat în fracţiuni de 0,02 *ml*. Mai jos tubul se lărgeşte şi este divizat în zecimi de *ml*. Aceleaşi diviziuni se găsesc şi deasupra robinetului. Robinetul cu 3 căi are un tub de scurgere lateral, astfel încît cu ajutorul lui lichidul se poate scurge în afară din cele două braţe ale ureometrului sau să se stabilească comunicaţia între ele.

Reactivi. 1) Hipobromit de sodiu. Se prepară proaspăt picurîndu-se 12 picături de brom la 6 *ml* NaOH 33%. 2) Soluţie Kowarsky (soluţie saturată de NaCl şi K_2SO_4) se prepară prin dizolvare a 150 g K_2SO_4 şi 350 g NaCl în 1000 *ml* apă fierbinte.

Tehnica. 4 *ml* sînge, recoltat pe anticoagulant (ex. NaF), se amestecă cu 4 *ml* soluţie acid tricloracetic 20%. După 10 minute se filtrează sau se centrifughează.

Între timp se umple ureometrul cu soluţia Kowarsky, stabilindu-se în acest scop cu ajutorul robinetului cu 2 căi, legătura dintre cele două braţe ale aparatului şi turnînd soluţia prin braţul negradat pînă cînd lichidul se urcă peste robinetul braţului gradat. Se va avea grijă să nu rămînă nici o bulă de aer în braţele sau robinetele aparatului. După umplere se închide robinetul superior şi se îndepărtează cu pipeta şi hîrtie de filtru lichidul de deasupra sa. Se deschide apoi robinetul cu 3 căi, astfel ca legătura să se facă între braţul gradat şi tubul lateral (de evacuare). Se introduce filtratul (sau supernatantul) tricloracetic clar în tu-

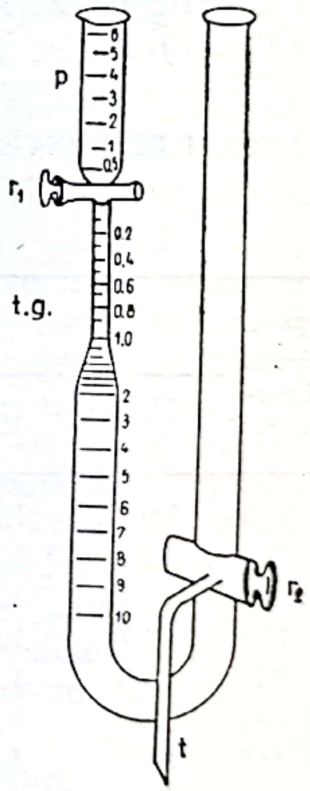


Fig. 29. Ureometrul Kowarsky. p. pîlnie prin care se introduce în aparat sîngele deproteinizat şi soluţia de hipobromat. r_1 = robinet simplu; r_2 = robinet cu trei căi; t = tub lateral de scurgere; tg = tub gradat.

bul gradat şi prin deschiderea uşoară a robinetului se lasă să intre în aparat exact 2,5 *ml*. Se închide robinetul şi cu ajutorul unei pipete se aspiră excesul de soluţie. Se spală apoi de 2 ori cu cîte 5—6 *ml* apă, procedînd în acelaşi fel. Se adaugă, în sfîrşit, în tubul gradat, 6 *ml* soluţie hipobromit lăsînd să intre în aparat numai 5 *ml*. Se închide robinetul şi se îndepărtează excesul de hipobromit. Se lasă în repaus 10—15 minute pentru degajarea completă a azotului din urină şi pentru a lua temperatura camerei.

Pentru citirea volumului de azot se procedează în felul următor: robinetul cu 3 căi se deschide în aşa fel încît să curgă afară din braţul negradat atîta lichid pînă cînd se ajunge în ambele braţe la acelaşi nivel în momentul în care stabilim comunicarea între ele. În acest moment se citeşte volumul gazului, temperatura şi presiunea. Se face eventual o probă martor în aceleaşi condiţii folosind în loc de ser, apă distilată. În lipsa unui barometru, volumul de azot găsit se înmulţeşte cu 2,0. Dacă avem barometru ne folosim de tabelul anexat (Tabel 9).

TABEL 9

FACTORI DE CONVERSIE DIN *ml* AZOT *m g* UREE ‰. PENTRU DETERMINAREA UREEI DUPĂ KOWARSKY. 1 *ml* AZOT CORESPUNDE LA *g* UREE ‰

Presiunea barometrică	*Temperatura*								
	10°	12°	14°	16°	18°	20°	22°	24°	25°
710	1,91	1,90	1,88	1,86	1,84	1,83	1,81	1,80	1,78
720	1,94	1,92	1,91	1,89	1,87	1,85	1,84	1,82	1,80
725	1,95	1,93	1,92	1,90	1,89	1,87	1,85	1,83	1,82
730	1,97	1,94	1,93	1,91	1,90	1,88	1,87	1,85	1,83
735	1,98	1,96	1,94	1,93	1,91	1,89	1,88	1,86	1,84
740	1,99	1,97	1,96	1,94	1,92	1,90	1,89	1,87	1,86
745	2,01	1,99	1,98	1,96	1,94	1,92	1,91	1,89	1,87
750	2,02	2,00	1,99	1,97	1,95	1,93	1,92	1,90	1,88
755	2,04	2,02	2,00	1,98	1,96	1,95	1,93	1,92	1,90
760	2,05	2,03	2,01	2,00	1,98	1,96	1,95	1,93	1,91
765	2,06	2,05	2,03	2,01	1,99	1,97	1,96	1,94	1,92
770	2,08	2,06	2,04	2,02	2,00	1,98	1,97	1,95	1,93

Dacă se lucrează pe 5 *ml* filtrat tricloracetic (în loc de 2,5 *ml*) valoarea găsită se va împărţi cu 2, iar dacă se iau în lucru 1,25 *ml* filtrat, rezultatele se înmulţesc cu 2.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul. Să presupunem că în proba de sînge am găsit 0,44 *ml* la 750 *mm* şi 18°C. Pentru aceste condiţii de temperatură şi presiune găsim în tabel factorul 1,95. Deci g uree‰ = 0,44·1,95 = 0,858‰ respectiv 85,8 *mg*%.

BIBLIOGRAFIE

Manta, I., Ciplea, Al., *Metodele laboratorului clinic,* Cartea Românească, Cluj, 1947.

3.4. | Dozarea acidului uric în ser

Principiu. Acidul uric, reduce reactivul fosfo-wolframic, în mediu alcalin, producînd un complex de culoare albastră, a cărei intensitate este proporţională cu concentraţia acidului uric în proba de analizat.

Densitatea optică a complexului colorat, se compară cu soluţia etalon de acid uric, la 610 *nm,* în cuva cu secţiunea de 1 *cm.*

Reactivi. 1) Reactiv fosfo-wolframic: se amestecă 50 *gr* wolframat de sodiu şi 40 *ml* acid fosforic 85% (D=1,71) cu 350 *ml* apă distilată, într-un balon de 1000 *ml,* prevăzut cu refrigerent cu reflux şi se fierbe lent, aproximativ 2 ore, după răcire se completează volumul la 500 *ml* cu apă distilată. Dacă reactivul este verde, se adaugă 1—2 picături de brom şi se fierbe cîteva minute fără refrigerent, pentru îndepărtarea excesului de brom. Reactivul are culoarea galben-verde deschis, se păstrează în sticlă brună şi este inalterabil. 2) Acid tricloracetic 20%; 3) Carbonat de sodiu cristalizat 22%. 4) Soluţie standard acid uric (soluţie stoc): 100 *mg* acid uric, 200 *mg* fosfat disodic, 100 *mg* fosfat monosodic se dizolvă în aproximativ 60 *ml* apă distilată caldă (60°C) şi se agită pînă la completa dizolvare. După răcire, se completează la 100 *ml* cu apă distilată, într-un balon cotat. 1 *ml* soluţie = 1 *mg* acid uric.

Soluţia etalon stoc, închisă ermetic prin parafinare (după adăugare de 3—4 picături cloroform), se poate păstra 4—5 luni, la temperatura de +4°C.

Soluţia etalon de lucru se prepară prin diluarea soluţiei stoc: 1 *ml* ad 100 *ml* apă distilată.

Se poate efectua o curbă de etalonare (luînd cantităţi diferite de soluţie standard acid uric) şi se determină conform metodei.

Tehnica. 1 *ml* ser, 2 *ml* apă distilată şi 1 *ml* acid tricloracetic 20% se pun într-o eprubetă de centrifugă, se amestecă prin uşoară

Scanned with OKEN Scanner

agitare, se lasă la temperatura camerei 5 minute, se centrifugează la 2500—3000 *t/min*, aproximativ 5 minute.

Din supernatant se iau 2 *ml* şi se amestecă cu 0,9 *ml* soluţie carbonat de sodiu şi 0,1 *ml* reactiv fosfowolframic. Se prepară o probă standard conţinînd 2 *ml* soluţie standard în locul filtratului şi o probă în alb în care reactivii se amestecă cu 2 *ml* apă distilată. Se lasă 10 minute la temperatura camerei şi se măsoară extincţia probei de ser şi a probei standard faţă de proba în alb la 610 *nm*. În cazul apariţiei unei opalescenţe se centrifughează.

Calcul

$$\text{acid uric } mg\% = \frac{\text{Extincţia probei}}{\text{Extincţia stand.}} \times 0{,}02 \times 200$$

Valori normale: 2—5 *mg*/100 *ml* ser

Uricemia creşte în bolile caracterizate prin alterarea metabolismului bazelor purinice (gută), în insuficienţa renală, decompensări cardiace, intoxicaţie cu plumb şi unele forme de leucemie.

BIBLIOGRAFIE

Heilmeyer, L., Krebs, W., Biochem. Z., 233, 1930, p. 365.

3.5. | Dozarea azotului amino-acidic

Este descrisă la capitolul analiza urinei (pag. 442).

3.6. | Dozarea amoniacului în sînge (metoda Reinhold şi Chung)

Principiu. Amoniacul eliberat din sînge este captat în acid sulfuric şi dozat pe baza reacţiei Berthelot utilizată şi în cazul determinărilor de azot ureic (vezi pct. 3.4.1.).

Reactivi. 1) Tampon borat-hidroxid de sodiu. Se dizolvă 9,6 g borat de sodiu cristalizat cu 10 molecule de apă şi 1,96 g hidroxid de sodiu (pelete) în 80 *ml* apă bidistilată. Se fierbe timp de 15 minute, se răceşte la temperatura camerei şi se aduce volumul la 100 *ml* cu apă bidistilată. Soluţia va avea *pH* 10,8. Acest tampon limitează formarea artefactuală de amoniac în sîngele de analizat. 2) H_2SO_4 1 *N*. 3) Standard de sulfat de amoniu. Se prepară o soluţie stoc prin dizol-

Scanned with OKEN Scanner

varea a 70,8 *mg* sulfat de amoniu p.a. în 80 *ml* apă bidistilată şi aducîndu-se volumul la 100 *ml*. Soluţia standard de lucru se prepară înainte de utilizare diluîndu-se 1 *ml* soluţie stoc la 100 *ml* cu apă bidistilată. Această soluţie conţine 1,5 µg azot amoniacal/1 *ml*. 4) Reactiv fenolic de culoare. 5) Reactiv hipoclorit. Ultimii doi reactivi au fost descrişi în legătură cu dozările de uree (vezi pct. 3.3.1).

Tehnica. Se pregătesc şase flacoane de plastic (polietilen sau polipropilen) de 50 *ml* de culoare brună (sau învelite în hîrtie neagră) — astupîndu-se cu dopuri de cauciuc bine spălate şi perfect adaptate la flacoanele respective. Prin dopurile de cauciuc pătrund în flacoane cîte o baghetă de sticlă pînă la jumătatea distanţei de la fundul flaconului respectiv. Capătul liber al baghetei care pătrunde în flacon este făcut rugos prin frecarea lui pe o piatră aspră de carborundum (piatră de polizor). Se notează flacoanele: două pentru proba de analizat, două pentru standard şi două pentru proba în alb. Se pipetează în fiecare flacon cîte 3 *ml* tampon borat-hidroxid de sodiu.

Sîngele de analizat trebuie recoltat pe EDTA disodic imediat înainte de efectuarea analizei, eprubeta răcindu-se pe o baie de gheaţă. Se pipetează cîte 2 *ml* din sîngele răcit şi se depun pe fundul celor două flacoane corespunzătoare probei de analizat. Pentru probele în alb se pipetează cîte 2 *ml* apă bidistilată lipsită de amoniac, iar în flacoanele probelor standard se pun cîte 2 *ml* soluţie standard de lucru (reactiv 3).

Lucrîndu-se cît mai repede posibil se scot dopurile flacoanelor, se înmoaie capătul rugos al baghetelor în acid sulfuric normal, se îndepărtează excesul de acid (scuturare) şi se reastupă flacoanele. Flacoanele vor fi menţinute în poziţie verticală.

Se montează flacoanele în poziţie verticală pe platforma unui dispozitiv de agitare (care efectuează mişcări de rotire). Agitarea se poate efectua şi cu ajutorul unor dispozitive electromagnetice. După 30 minute de agitare se scot flacoanele din dispozitivul de agitare, avîndu-se grije să nu se stropească baghetele cu amestecul de sînge şi tampon. Se scot apoi dopurile iar baghetele (capătul rugos) se spală într-o eprubetă cu 1 *ml* reactiv fenolic de culoare (reactiv 4). Se adaugă 1 *ml* reactiv hipoclorit alcalin (reactiv 5). După amestecare se incubează 15 min la 37°C acoperindu-se eprubetele cu parafilm sau foiţă de staniol pentru a se preveni o contaminare cu amoniac din aer.

Se scot eprubetele din baia de apă şi se adaugă cîte 3 *ml* apă bidistilată lipsită de amoniac. Se agită şi se citesc extincţiile la 630 *nm* faţă de proba în alb. Culoarea celor două probe în alb trebuie să fie identică. Orice diferenţă vizibilă între aceste două probe în alb sugerează o contaminare cu amoniac iar determinarea trebuie repetată.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul $\frac{E \text{ probei de analizat}}{E \text{ standard}} \times 150 = \mu g$ azot amoniacal/100 *ml*

Valorile normale sînt încă discutate în literatura medicală. Cu această metodă valorile normale sînt de 30—55 μg azot amoniacal la 100 *ml*. Valorile de pînă la 200 μg/100 *ml* semnalate de alţi autori se datoresc probabil unor artefacte.

Creşteri marcate ale azotului amoniacal se întîlnesc în comele hepatice şi în unele cazuri rare, caracterizate prin defecte cu caracter genetic în sistemele enzimatice care produc transformarea amoniacului în uree la nivelul ficatului (hiperamoniemii familiale).

BIBLIOGRAFIE

Reinhold, I. G., Chung, C. C., Clin. Chem., 7 (1961), p. 54.

3.7. | Dozarea creatininei şi creatinei în ser

3.7.1. | DOZAREA CREATININEI SERICE

Principiu. Creatinina formează cu acidul picric în mediu alcalin un complex de culoare roşie-portocalie (reacţia Jaffé).

Reactivi. 1) Wolframat de sodiu 10%. 2) H_2SO_4 2/3 *N*. 3) Soluţie saturată de acid picric. 4) NaOH 10%. 5) Soluţie picrat alcalin. Se prepară înainte de utilizare amestecîndu-se 10 volume soluţie saturată de acid picric filtrată cu 2 volume NaOH 10%. 6) Soluţie standard de creatinină. Se prepară o soluţie stoc, dizolvîndu-se în HCl 0,1 *N* 100 *mg* creatinină pură sau 160,2 *mg* clorură de zinc creatinină şi aducîndu-se volumul la 100 *ml* cu HCl 0,1 *N*. 7) Soluţie standard de lucru se obţine diluîndu-se 1 *ml* din soluţia stoc la 100 *ml* cu apă distilată. Această soluţie conţinînd 0,01 *mg* creatinină/*ml* trebuie reînnoită săptămînal.

Tehnica dozării creatininei. Se amestecă într-un tub de centrifugă 2 *ml* ser cu 2 *ml* apă distilată, 1 *ml* wolframat de sodiu 10% şi 1 *ml* H_2SO_4 2/3 *N*. Se amestecă fără a se agita şi după cîteva minute se centrifughează la 3000 rotaţii/*min*, timp de 5—10 *min*. Din supernatantul clar se pipetează 3 *ml* care se amestecă într-o eprubetă cu 1,5 *ml* soluţie picrat alcalin (reactiv 5). Se prepară două probe standard dintre care în una (standard I) se înlocuiesc cei 3 *ml* supernatant cu 3 *ml* soluţie standard de lucru (reactiv 7) iar în cealaltă (standard II) se pun în loc de supernatant, 1 *ml* soluţie standard de lucru şi 2 *ml* apă distilată. Proba în alb se prepară amestecîndu-se 3 *ml* apă distilată cu 1,5 *ml* picrat alcalin.

Scanned with OKEN Scanner

Se amestecă bine și după 10 minute se citesc extincțiile la 520 *nm* față de proba în alb.

Calcul. Se ia în considerare extincția probei standard care este mai apropiată de valoarea citită pentru proba de analizat.

Folosind standard I

$$\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 0{,}03 mg \times \frac{100\ ml}{1\ ml} = \frac{E \text{ probei}}{E \text{ stand.}} \times 3 = mg \text{ creatină}/100\ ml \text{ ser}$$

Folosind standard II

$$\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 0{,}01\ mg \times \frac{100\ ml}{1\ ml} = \frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 1 = mg \text{ creatină}/100\ ml \text{ ser}$$

Valori normale și interpretare: 0,4—1,3 *mg*/100 *ml*. La copii valorile sînt cu ceva mai joase. Creatininemia crește în distrucții ale musculaturii și mai ales în insuficiența renală.

3.7.2. | DOZAREA CREATINEI ÎN SER (CREATININA TOTALĂ)

Principiu. Creatina din plasma deproteinizată este convertită în creatinină prin încălzirea prelungită în mediu acid. Se dozează apoi creatinina totală pe baza reacției Jaffé (vezi pct. 3.7.1.) iar diferența între creatinina totală și creatinina dozată fără o prealabilă încălzire (vezi pct. 3.7.1.) reprezintă valoarea creatinei serice.

Reactivi. 1) HCl 5 *N*. 2) Toți reactivii necesari pentru dozarea creatininei.

Tehnica. Se deproteinizează plasma așa cum s-a arătat mai sus vezi pct. 3.7.1.). Se pipetează 3 *ml* supernatant care se amestecă într-o eprubetă cu 0,5 *ml* HCl 5 *N*. Se astupă bine eprubeta (cu dop rodat) și se încălzește 24 *h* la 60°C într-o etuvă uscată. După răcire se adaugă 2,5 *ml* picrat alcalin. Se prepară o probă standard conținînd 3 *ml* soluție standard de lucru (standard I), 0,5 *ml* HCl 5 *N* și 2,5 *ml* picrat alcalin. Proba în alb va conține 3 *ml* apă distilată 0,5 *ml* HCl 5 *N* și 2,5 *ml* picrat alcalin. După 10 *min.* se citesc extincțiile la 520 *nm* față de proba în alb.

Calcul $\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 3 = mg$ creatină totală/100 *ml* ser

creatinina totală—creatinina dozată din supernatantul neîncălzit (vezi pct. 3.7.1.) = creatinină derivată din creatină.

mg creatină/100 *ml* = creatinină derivată din creatină × 1,16

1,16 reprezintă un factor de conversiune al creatininei în creatină; creatina avînd o moleculă de H_2O în plus față de creatinină.

Scanned with OKEN Scanner

Valori normale și interpretare. La adulți valorile normale sînt de 0,2—0,4 *mg*/100 *ml*, iar la copii valorile sînt cu ceva mai ridicate. Creatinemia crește în boli ale musculaturii (distrofii musculare progresive, miastenii, dermatomiozite). Determinarea creatinuriei are însă o valoare diagnostică mai mare (vezi pag. 446).

Observații. Reacția Jaffé nu este specifică pentru creatinină, fiind dată și de alți compuși cum ar fi glutationul redus și ergotionina. În ser acești compuși sînt în cantitate minimă, astfel încît erorile sînt neglijabile. În schimb, în hematii concentrația acestor compuși este suficient de mare pentru a produce valori artificial crescute ale creatininei și mai ales creatinei întrucît fierberea în mediu acid a filtratelor de sînge eliberează produși care reacționează cu acidul picric. Este recomandabil să se lucreze doar pe ser sau plasmă și ca fiecare laborator să-și stabilească valorile normale în special pentru creatină.

Dozări mai specifice se pot obține prin adsorbția creatininei pe un silicat de aluminiu (reactiv Loyd) după metoda dată de Hare (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 74 (1950) p. 148).

BIBLIOGRAFIE

Lynch, M. I., *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology*, Ed. W. B. Saunders, Phyladelphia—London—Toronto, 1969.

3.8. | Substanțele azotate neproteice și insuficiența renală (Interpretare)

Substanțele azotate neproteice a căror dozare a fost arătată în aceste capitole (uree, acid uric, polipeptide, creatinină) au în comun următoarele particularități: a) rezultă din catabolismul proteinelor și b) se elimină pe cale urinară.

Creșterea acestor substanțe în ser indică deci fie o exagerare a catabolismului proteic, fie o perturbare a funcției de excreție. De fapt insuficiențele renale duc la cea mai exprimată creștere a acestor substanțe în sînge realizînd azotemiile. De regulă determinările de azot ureic care pot fi efectuate cu multă precizie și destul de simplu sînt suficiente pentru necesitățile clinice. Dozările de creatinină și de azot neproteic (azot restant) pot aduce însă uneori informații suplimentare.

Astfel în timp ce ureea rezultă în special din catabolismul proteinelor alimentare, creatinina reprezintă un indicator al degradărilor țesuturilor proprii. În cazul unei nefropatii care perturbă eliminarea substanțelor azotate prin urină, creșterea azotului ureic poate fi dimi-

Scanned with OKEN Scanner

nuată parţial prin reducera ingestiei de proteine, în timp ce creşterea creatininei nu este afectată de măsuri dietetice.

S-a mai arătat că în cursul azotemiilor produse prin deshidratare creşterea azotului ureic este mult mai accentuată decît creşterea creatininei. În schimb, în insuficienţele renale apărute în mod brusc la subiecţi musculoşi şi mai ales în caz de sindrom de strivire, creşterile de creatinină sînt deosebit de exprimate. De asemenea, în hidronefrozele acute raportul azot ureic/creatinină scade de la valorile normale de 10:1 pînă la 5:1.

În literatura mai veche s-a atribuit o importanţă clinică creşterii azotului rezidual (azot neproteic—azot ureic) fenomen care ar indica apariţia unei insuficienţe hepatice la un renal. Astăzi există însă teste hepatice mult mai fidele, astfel încît importanţa calculării azotului rezidual a diminuat.

BIBLIOGRAFIE

Hoffman W. S. — The Biochemistry of Clinical Medicine. Ediţia IV-a. Year Book Medical Publisher Inc. Chicago 1970, p. 351—363.

4. | HEMOGLOBINA ŞI DERIVAŢII

4.1. | Determinarea hematocritului

Prin hematocrit se înţelege fracţia elementelor figurate din sînge (eritrocite, plăcuţe şi leucocite) în procente din sîngele total.

Pentru determinarea hematocritului este necesar să se centrifugheze sîngele total pînă cînd celulele ating un volum minim. Înălţimea coloanei celulelor este apoi comparată cu înălţimea totală de lichid şi fracţia celulelor exprimată în procente.

Există două posibilităţi de determinare a hematocritului.

1) În metodele vechi se utilizau forţe centrifugale relativ mici, pînă la 1370 *g* (această forţă corespunde la 3000 rot/*min.* şi o durată de centrifugare de 60 *min.*, raza tubului de centrifugă — distanţa de la capătul tubului la rotor — fiind de 15 *cm*). Aceste metode prezintă dezavantajul că necesită timp de centrifugare îndelungat, iar citirea rezultatului este destul de imprecisă.

2) În metodele noi se utilizează centrifugi care pot dezvolta forţe centrifugale de peste 10000 *g*. În acest caz durata de centrifugare se reduce la 2—3 *min.* Se folosesc capilare de sticlă heparinate pentru recoltarea sîngelui, cu dimensiuni variate după tipul centrifugii. Sîngele se recoltează prin înţeparea degetului sau a lobului urechii, se în-

chide tubul capilar la un capăt cu plastilină, sau la flacără, apoi se supune centrifugării. Pentru citirea rezultatului se utilizează aparate de măsură auxiliare centrifugii.

Modelele noi de centrifugi sînt de obicei dotate cu mai multe rotoare, astfel încît pot fi folosite nu numai la determinarea hematocritului, ci şi la alte centrifugări, pentru volume pînă la 3 *ml.* Atingerea vitezei maxime cu aceste centrifugi se face în cîteva secunde, astfel încît acest timp fiind foarte scurt, nu se ia în considerare.

Aparatul Hedin

Constă din două capilare gradate de la 0—100, de 35—50 *mm* lungime şi cu lumenul de 0,5 *mm,* care se prind într-un cadru metalic, cu ajutorul căruia se pot fixa la axul centrifugii. Sîngele capilar se aspiră în tubul de sticlă adaptat la un tub de cauciuc, avînd grijă să se umple complet tubul capilar. Se fixează apoi tubul de sticlă în cadrul de metal şi se adaptează pe centrifugă. Se centrifughează pînă coloana roşie rămîne la aceeaşi înălţime, adică cca 60 *min.* la 3000 rot/*min.* Valoarea hematocritului se citeşte direct pe tubul Hedin.

Microcentrifuga TH 12, H. Janetzki, Leipzig

Aceasta este microcentrifuga cea mai răspîndită în laboratoarele clinice din ţara noastră. Unul dintre rotoarele cu care este prevăzută are 24 locaşuri pentru capilarele cu sînge.

Se recoltează sîngele capilar în tuburile de sticlă heparinate, procurate din comerţ sau heparinate în laborator (se foloseşte o soluţie diluată de heparină, după care tuburile sînt uscate timp de 2 ore la 110—150°C). Capilarele au o lungime de 50 sau 75 *mm* şi un diametru de cca 0,5 *mm.* Se umplu cu sînge cca 4/5 din lungime, apoi se astupă capătul cu sînge cu plastilină sau la flacără. Se introduc în centrifugă cu capătul liber înspre axul centrifugii, aşezate simetric pentru echilibrare. Se centrifughează timp de 3—4 minute, apoi se scot tuburile şi se aşază într-un stativ.

Citirea rezultatului se face după o nomogramă (există în dotarea aparatului), la care se află ataşat un dispozitiv special. Se aşază tubul într-un şănţuleţ şi se deplasează cu ajutorul unui şurub astfel ca baza coloanei eritrocitare să fie la linia O. Se deplasează apoi vertical dispozitivul, aducînd meniscul plasmei la linia A. Se citeşte în această poziţie valoarea hematocritului pe nomogramă.

Scanned with OKEN Scanner

4.2. | Dozarea hemoglobinei

Conținutul în hemoglobină al sîngelui poate fi determinat indirect pe baza conținutului în fier sau a capacității de fixare a oxigenului. În practică se utilizează însă metodele fotometrice care măsoară pigmentul fie sub formă de oxihemoglobină, fie sub formă de cianmethemoglobină.

4.2.1. | DOZAREA HEMOGLOBINEI CA CIANMETHEMOGLOBINĂ

Principiu. Hemoglobina este transformată în cianmethemoglobină prin adăugarea de fericianură de potasiu și cianură de sodiu, iar densitatea optică a soluției de cianmethemoglobină se citește la 540 *nm*.

Reactivi. 1) *Reactiv Drabkin:* 50 *mg* cianură de potasiu, 1 *g* bicarbonat de sodiu și 200 *mg* fericianură de potasiu se dizolvă în apă distilată și se aduce volumul la 1000 *ml* cu apă distilată. 2) Standard de cianmethemoglobină (preparate comerciale). Detalii privind concentrația standardului și modul de lucru sînt furnizate împreună cu preparatul respectiv. Soluțiile se păstrează timp de un an la +4°C.

Tehnica. Se dizolvă 0,02 *ml* sînge cu 5 *ml* reactiv Drabkin, iar după 20 minute se citește extincția la 540 *nm* față de apă distilată sau față de reactivul Drabkin. Nivelul de hemoglobină în *g*/100 *ml* se obține dintr-o curbă de calibrare preparată cu ajutorul standardului.

Observații. Metoda cu cianmethemoglobină detectează toate formele de hemoglobină și permite determinări foarte precise.

Necesită însă un standard de cianmethemoglobină iar reactivul Drabkin conținînd cianură este extrem de toxic. Calcularea conținutului de hemoglobină în *g*/100 *ml* se poate efectua și fără curbă de calibrare măsurîndu-se însă de fiecare dată atît extincția probei de analizat cît și extincția unei soluții standard.

$$g \text{ hemoglobină}/100\ ml = \frac{E.\ \text{probă}}{E.\ \text{standard}} \cdot C_s \cdot \frac{5{,}02}{0{,}02} \cdot \frac{1}{1000}$$

$$g \text{ hemoglobină}/100\ ml = \frac{E.\ \text{probă}}{E.\ \text{standard}} \cdot C_s \cdot 0{,}251$$

unde C_s este concentrația standardului în *mg*%. În lipsa unui standard de cianmethemoglobină se poate calcula conținutul în hemoglobină pe baza coeficientului molar de extincție ($\varepsilon = 11,\ 0 \times 10^3$) și a greutății moleculare a hemoglobinei (16.114)

$$g \text{ hemoglobină}/100\ ml = \frac{E.\ \text{probă} \times 16.114}{11.000} \times 10^{-1} \times \frac{5{,}02}{0{,}02} =$$

$$= E \cdot \text{probă} \times 36{,}8.$$

Scanned with OKEN Scanner

Atragem însă atenţia că utilizarea acestui mod de calcul implică utilizarea unor spectofotometre cu o mare putere de rezoluţie. Coeficientul de 36,8 trebuie verificat în fiecare laborator utilizînd probe de sînge al căror conţinut în hemoglobină a fost determinat cu precizie pe baza comparării cu un standard de cianmethemoglobină.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie, Clinique théorique et pratique,* Doin, Paris, 1967.

4.2.2. | DOZAREA HEMOGLOBINEI CA OXIHEMOGLOBINĂ

Principiu. Soluţiile diluate de amoniac produc hemoliza sîngelui din proba de analizat şi totodată împiedică oxidarea hemoglobinei spre methemoglobină. Oxihemoglobina care rezultă este apreciată în funcţie de densitatea optică a soluţiei la 540 *nm.*

Reactivi. 1) Hidroxid de amoniu 0,1%. Se diluează 4 *ml* soluţie amoniac concentrat (d=0,88) cu apă distilată aducîndu-se volumul la 1000 *ml.*

Tehnica. 0,02 *ml* sînge se diluează cu 5 *ml* hidroxid de amoniu diluat şi se citeşte extincţia la 540 *nm* faţă de apă distilată.

Curba de calibrare se obţine făcîndu-se diluţii dintr-un sînge a cărui conţinut în hemoglobină a fost determinat în prealabil pe baza conţinutului în fier cu metoda Wong (vezi mai jos pct. 4.2.3.).

Observaţii. Este recomandabil ca sîngele din care se vor face dozări pentru trasarea curbei de calibrare să fie în prealabil centrifugat la 2500 turaţii pe minut, timp de 5 minute, iar plasma supernatantă să fie îndepărtată. Concentratul de eritrocite astfel obţinut permite trasarea unei curbe care să includă şi valori crescute ale hemoglobinemiei, întîlnită la pacienţii poliglobulici.

Se efectuează cel puţin 3 determinări de fier din acest sînge (eventual 3 diluţii diferite) şi se calculează conţinutul în hemoglobulină (vezi mai jos pct. 4.2.3.). Se pipetează apoi cîte 0,02 *ml* din concentratul de eritrocite şi din diluţii ale acestuia în ser fiziologic (diluţii de 75%, 50%, 25% şi 12,5%) şi se amestecă cu 5 *ml* hidroxid de amoniu 0,1% (reactiv 1). După citirea extincţiei la 540 *nm* se trasează curba de calibrare trecîndu-se pe abscisă concentraţiile de hemoglobină în g/100 *ml* iar pe ordonată extincţiile corespunzătoare.

Valorile hemoglobinei în probele de analizat se obţin prin interpolare în curba de calibrare. Pentru valori foarte scăzute ale hemoglobinemiei (anemii exprimate) se recomandă folosirea unei cantităţi duble de sînge (0,04 *ml* în 5 *ml* reactiv 1) împărţindu-se apoi rezultatul la cifra 2.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda este suficient de precisă, nu necesită standard de hemoglobină, nu este influențată de creșterea bilirubinei serice, evitîndu-se totodată reactivul cu cianură utilizat în metoda precedentă. Această metodă nu detectează însă unele forme patologice de hemoglobină cum ar fi sulfhemoglobina sau methemoglobina.

BIBLIOGRAFIE

Lynch, M. L., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., Inwood, M. Y. H., *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology*, Ed. W. B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 1969.

4.2.3. DETERMINAREA HEMOGLOBINEI PE BAZA CONȚINUTULUI ÎN FIER (METODA WONG)

Principiu. Fierul este eliberat din hemoglobină prin tratarea cu acid sulfuric concentrat și persulfat de potasiu. După precipitarea proteinelor cu acid tungstic (wolframic), fierul din filtrat reacționează cu tiocianatul de potasiu formînd tiocianat feric de culoare roșie-brună. Se calculează apoi conținutul în hemoglobină al sîngelui, știindu-se că 100 *g* hemoglobină conțin 0,338 *g* fier.

Reactivi. Acid sulfuric concentrat. 2) Soluție saturată persulfat de potasiu: 7 *g* $K_2S_2O_8$ se agită cu 100 *ml* apă distilată la temperatura camerei timp de 30 *min*. Se lasă să sedimenteze și se folosește supernatantul. Se păstrează la +4°C. 3) Soluție wolframat de sodiu 10%. 4) Soluție tiocianat de potasiu (se dizolvă 146 *g* KSCN în apă bidistilată și se aduce volumul la 500 *ml*). 5) Soluție standard de fier conținînd 0,1 *mg* fier/*ml*. Se disolvă 0,7 *g* sulfat dublu feroamoniacal cristalizat (sare Mohr, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$, în 100 *ml* apă bidistilată. Se adaugă 5 *ml* acid sulfuric concentrat, se încălzește ușor și se adaugă picătură cu picătură o soluție concentrată de permanganat de potasiu pînă la apariția unei culori roz care persistă cel puțin 30 secunde. Se răcește la temperatura camerei și se completează la 1 litru cu apă bidistilată.

Tehnica. Se pipetează 0,5 *ml* sînge heparinat într-un balon cotat de 50 *ml*. Se adaugă 2 *ml* acid sulfuric concentrat și se agită bine timp de două minute. Se adaugă apoi pe rînd, amestecîndu-se 2 *ml* soluție persulfat de potasiu, 20 *ml* apă bidistilată și 2 *ml* soluție wolframat de sodiu 10%. Se completează volumul la 50 *ml* și se amestecă din nou. Se filtrează utilizînd hîrtie de filtru Whatman nr. 1.

Într-un alt balon cotat de 50 *ml* se prepară o probă standard adăugîndu-se pe rînd 25 *ml* apă bidistilată, 2 *ml* acid sulfuric concen-

Scanned with OKEN Scanner

trat, 2 *ml* persulfat de potasiu şi 2,5 *ml* soluţie standard de fier. Se completează la 50 *ml* cu apă bidistilată.

Proba în alb se prepară în acelaşi fel înlocuindu-se însă soluţia standard de fier cu 2,5 *ml* apă bidistilată. Se iau apoi în trei eprubete diferite cîte 10 *ml* din filtratul de sînge, din proba standard şi din proba în alb şi se adaugă cîte 0,5 *ml* persulfat de potasiu (reactiv 2) şi 2 *ml* soluţie tiocianat de potasiu (reactiv 4). Se agită, iar, după 30 minute, se citesc extincţiile la 540 *nm* faţă de proba în alb.

$$\text{Conţinutul în fier al sîngelui } mg/100\ ml = \frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 50$$

$$\text{Conţinutul în hemoglobină } g/100\ ml = \frac{mg \text{ fier la } 100\ ml \text{ sînge}}{3{,}38}$$

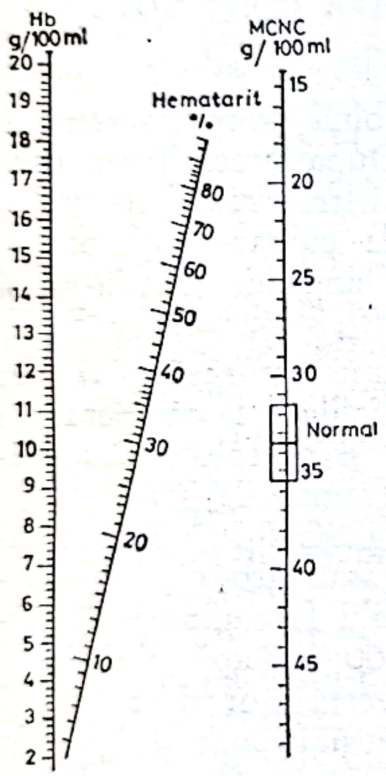


Fig. 30. Nomogramă pentru calculul concentraţiei medii a hemoglobinei din eritrocite (MCHC) pe baza concentraţiei în hemoglobină şi a hematocritului. Se unesc printr-o dreaptă valorile concentraţiei în hemoglobină şi a hematocritului iar prelungirea acestei drepte intersectează valoarea corespunzătoare a concentraţiei de hemoglobină/100 *ml* eritrocite.

Observaţii. Dozarea hemoglobinei pe baza conţinutului de fier poate servi ca metodă de referinţă pentru calibrarea unor metode mai simple de dozare a hemoglobinei (vezi pag. 154) în lipsa unui standard de hemoglobină (respectiv cianmethemoglobină).

BIBLIOGRAFIE

Wong, S. Y., J. Biol. Chem., 77, 1928, p. 409.

4.3. Conţinutul în hemoglobină al hematiilor

După Wintrobe se poate calcula mărimea eritrocitelor şi conţinutul lor în hemoglobină, cunoscînd hematocritul în procente, concentraţia hemoglobinei în g/100*ml* şi nr. eritrocitelor în $10^6/mm^3$ (microlitri).

Dintre aceşti trei parametri numărul eritrocitelor nu este determinat în mod exact. După Wintrobe se defineşte concentraţia medie a eritrocitelor în hemoglobină sau „mean corpuscular hemoglobin concentration" (MCHC) prin formula următoare:

$$MCHC = \frac{\text{hemoglobină } (g/100\ ml) \cdot 100}{\text{hematocrit } (\%)}\ g/100\ ml \text{ eritrocite}$$

Pentru o caracterizare mai aprofundată se utilizează următoarele mărimi:

— Volumul mediu al eritrocitelor: "mean corpuscular volume" (*MCV*), calculat după formula:

$$MCV = \left| \frac{\text{hematocrit (\%)} \cdot 10}{\text{nr. eritrocite } (10^6/mm^3)} \right. \mu m^3$$

— Conținutul mediu de hemoglobină al eritrocitelor: "mean corpuscular hemoglobin" (*MCH*), care se calculează astfel:

$$MCH = \frac{\text{hemoglobină } (g/100\ ml) \cdot 10}{\text{nr. eritrocrite } (10^6/mm^3)}\ pg \text{ (picograme)}$$

— Diametrul mediu al eritrocitelor, determinat prin curba Price-Jones, "mean cell diameter" (*MCD*), calculat în micrometri (μm).

— Grosimea medie a eritrocitelor: "mean cellular thickness" (*MCT*), calculat după formula:

$$MCT = \frac{MCV}{\left(\frac{MCD}{2}\right)^2 \times \pi}\ \mu m$$

Valori normale: 1,7—2,3 μm.

Valorile normale pentru toți acești parametri sînt date în tabelul 26 în funcție de vîrstă.

TABEL 10

VALORI MEDII ALE NORMALITĂȚII PENTRU CÎȚIVA PARAMETRI AI ERITROCITELOR

Vîrsta	*Nr. eritrocite* $10^6/nm^3$	*Hemoglobină* *g/100 ml*	*Hematocrit* *(în %)*	*MCV* μm^3	*MCH* *pg*	*MCHC* *g/100 ml*	*MCD* μm
ziua I-a	5,1±1,0	19,5±5,0	54,0±1,0	106	38	36	8,6
zilele 2—3	5,1	19,0	53,4	105	37	35	
zilele 4—8	5,1	18,3±4,0	52,5	103	36	35	
zilele 9—13	5,0	16,5	49,0	98	33	34	
zilele 14—60	4,7±0,9	14,0±3,3	42,0±7,0	90	30	33	8,1
lunile 3—5	4,5±0,7	12,2±2,3	36,0	80	27	34	7,7
lunile 6—12	4,6	11,8	35,5±5,0	77	26	33	7,4
anul 1	4,5	11,2	35,0	78	25	32	7,3
anul 2	4,6	11,5	35,5	77	25	32	
anul 3	4,5	12,5	36,0	80	27	35	7,4
anul 4	4,6±0,6	12,6	37,0	80	27	34	
anul 5	4,6	12,6	37,0	80	27	34	
anii 6—10	4,7	12,9	37,5	80	27	34	7,4
anii 11—15	4,8	13,4	39,0	82	28	34	
adulți: femei	4,8±0,6	14,0±2,0	42,0±5,0	87±5	29±2	34±2	7,5±0,3
bărbați	5,4±0,8	16,0±2,0	47,0±5,0	87±5	29±2	32±2	7,5±0,3

Scanned with OKEN Scanner

Richterich, R., *Chimie clinice théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967. Wintrobe, M. M., *Clinical hematology*, ed. 4, Lea & Fiebiger, Philadelphia, 1956.

4.4. | Dozarea methemoglobinei

Principiu. Methemoglobina prezintă un maximum de absorbţie caracteristic la 630 *nm*. Transformînd methemoglobina în cianmethemoglobină (prin cianură de potasiu) acest maxim dispare. În proba *A* se transformă toată hemoglobina în methemoglobină cu ajutorul fericianurii de potasiu. După adăugarea cianurii toată hemoglobina (hemoglobină + methemoglobină) este prezentă sub formă de cianmethemoglobină. În proba *B* se transformă doar methemoglobina prezentă în cianmethemoglobină. Diferenţa de extincţie la 630 *nm* este direct proporţională cu concentraţia methemoglobinei.

Reactivi. 1) Soluţia de fericianură de potasiu 152 *mM;* se dizolvă 5 *g* fericianură de K în apă distilată şi se aduce la 100 *ml*. Se conservă în flacoane brune. 2) Soluţia de cianură de potasiu 77 *mM* (otravă puternică!): se dizolvă 500 *mg* KCN în apă distilată şi se aduce volumul la 10 *ml*. 3) Tampon collidină 50 *mM*, *pH* 0,7: vezi prepararea la anexă.

Tehnica. Se hemolizează 0,2 *ml* sînge în 5 *ml* apă bidistilată. Se lasă în repaus 10 minute şi se adaugă 5 *ml* tampon collidină, apoi se centrifughează puternic. Se pregătesc în cuve probele *A* şi *B:*

Soluţii	*A*	*B*
Supernatant (*ml*)	3,0	3,0
Sol. fericianură de K	1 pic.	—
Apă bidistilată	—	1 pic.
Se citeşte extincţia la 630 *nm*:	$E_1(A)$ şi	($E_1(B)$
Sol. cianură de potasiu	1 pic.	1 pic.
După cel puţin 5 *min* se citesc încă odată extincţiile la 630 *nm*: $E_2(A)$ şi $E_2(B)$		

Calcul

$$\% \text{ methemoglobină} = \frac{E_1(B) - E_2(B) \cdot 100}{E_1(A) - E_2(A)}$$

Valori normale: 0,2—1% din hemoglobina totală. Methemoglobina creşte după ingestia de aniline, acetanilidă, nitriţi şi unele sulfa-

mide. Uneori methemoglobina e consecinţa unor defecte enzimatice ale eritrocitelor (vezi pag. 380).

Observaţie. În locul tamponului de collidină se poate folosi tampon fosfat 0,016 *M*, *pH* = 6,5 (vezi anexa) iar în locul cianurii de potasiu se poate folosi cianură de sodiu. Metoda este specifică pentru methemoglobină. Ea nu se poate aplica dacă sînt prezente unele tipuri de hemoglobină *M* (hemoglobine anormale în care fierul este trivalent). În acest caz conţinutul în methemoglobină se determină în mod aproximativ prin capacitatea de fixare a oxigenului.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique théoretique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

4.5. | Dozarea carboxihemoglobinei (CO-Hb)

Principiu. Dacă avem două substanţe care au spectre de absorbţie diferite, se pot trage concluzii asupra concentraţiei celor două componente plecînd de la coeficientul de extincţie, pentru lungimi de undă diferite şi adecvate. În cazul de faţă se determină carboxihemoglobina în procente din hemoglobina totală. În acest scop hemoglobina, şi nu carboxihemoglobina, este transformată în oxihemoglobină prin amoniac. Pe baza spectrelor diferite de absorbţie ale oxihemoglobinei şi carboxihemoglobinei se poate determina carboxihemoglobina, măsurînd extincţia la două perechi de lungimi de undă (541/561 *nm* şi 561/577 *nm*). Adăugarea saponinei la soluţia de amoniac împiedică apariţia opalescenţei. Practic se recomandă să se măsoare şi extincţiile la 573 şi 597 *nm*, puncte isosbestice, pentru a elimina interferenţa altor pigmenţi sau a opalescenţei.

Reactiv. Se dizolvă 1,5 *g* saponină în amoniac 0,1 *n* şi se aduce volumul la 100 *ml* cu amoniac 0,1 *n*. Se amestecă bine înainte de utilizare. Stabilitate nelimitată.

Tehnica. Într-un tub de centrifugă se pun 0,02 *ml* sînge capilar în 5 *ml* soluţie de saponină. Se amestecă cu prudenţă (nu se agită fiindcă carboxihemoglobina se disociază). După scurt timp se centrifughează puternic.

Supernatantul este pus într-o cuvă spectrofotometrică de 1 *cm* şi se citesc extincţiile faţă de soluţia de saponină-amoniac la: 541, 561, 573, 577 şi 597 *nm*.

Scanned with OKEN Scanner

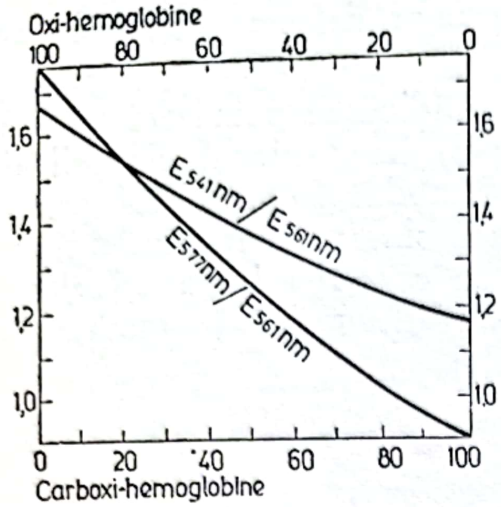


Fig. 31. Nomogramă pentru calculul concentrației carboxihemoglobinei. Se trec pe curbele respective valorile obținute în cazul dat pentru rapoartele *E* 541 *nm*/*E* 561 *nm* și *E* 577 *nm*/*E* 561 *nm*. Se unesc printr-o dreaptă cele două puncte notate pe curbe, iar prelungirea acestei drepte intersectează valorile în procente ale oxihemoglobinei și carboxihemoglobinei.

Calcul. 1) Se calculează raportul $\frac{E(573\ nm)}{E(597\ nm)}$. Dacă valoarea este cuprinsă între 8,17 și 8,29 se poate continua calculul.

2) Se calculează rapoartele: $\frac{E(541\ nm)}{E(561\ nm)}$ și $\frac{E(577\ nm)}{E(561\ nm)}$ Se citește concentrația carboxihemoglobinei în procente direct pe nomograma din fig. 31.

Valori normale. La nefumători valorile sînt de obicei sub 0,5%, iar valori pînă la 2% carboxihemoglobină sînt considerate în limite fiziologice. Valorile pot crește pînă la 6,5% la fumători. În intoxicațiile mortale cu CO s-au notat valori de pînă la 65%.

Observații. 1) Dacă raportul *E*(573)/*E*(597) este mai mic decît 8,17 este vorba de alți derivați ai hemoglobinei sau de o opalescență. Aceasta din urmă se poate elimina prin centrifugare prelungită. 2) Extincția depinde de temperatură, de aceea trebuie lucrat la temperatură constantă. 3) Sîngele poate fi conservat cîteva zile înainte de determinare, în flacon bine închis. 4) Metoda dă rezultate exacte doar dacă se utilizează un spectrofotometru cu rezoluție bună.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique théoretique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

4.6. Dozarea hemoglobinei fetale (hemoglobina F sau „rezistentă la alcalii")

Principiu. Hemoglobina adultului (HbA) este denaturată de 100 ori mai repede prin acțiunea sodei caustice decît hemoglobina fetală (HbF). Dacă se lasă să acționeze o soluție de hidroxid de sodiu timp de 2 *min.* asupra unui hemolizat, practic toată HbA este denaturată,

Scanned with OKEN Scanner

în timp ce numai cca 12% din HbF este denaturată. Rezultatul nu ține seama de cantitatea de HbF denaturată, ci se exprimă în procente din hemoglobină „rezistentă la alcalii".

Pentru analiză se adaugă la probă hidroxid de sodiu. După exact 2 *min.* se întrerupe procesul de denaturare, adăugînd o soluție saturată de sulfat de amoniu, care produce totodată o precipitare a hemoglobinei denaturate. Concentrația de hemoglobină din hemolizat este determinată fotometric înainte de adăugarea NaOH și considerată ca 100%. Citirea după adăugarea sulfatului de amoniu dă rezultatul în procente.

Reactivi. 1) Soluție de NaOH 1,2 *n.* 2) Soluție saturată la rece de sulfat de amoniu. 3) Reactiv Drabkin (vezi dozarea hemoglobinei).

Tehnica. 1) Se prepară un hemolizat din 0,5 *ml* eritrocite spălate, hemolizate cu două părți de apă bidistilată. Se determină hemoglobina după metoda transformării în cianmethemoglobină (vezi anterior). Se aduce concentrația hemolizatului la 500 *mg*/100 *ml* cu soluția Drabkin. 2) La 2,8 *ml* hemolizat, plasat în baie de apă la 20°C, se adaugă 0,2 *ml* NaOH și se amestecă bine. După exact 2 *min.* (măsurate cu cronometru) se adaugă 2 *ml* soluție de sulfat de amoniu. Se centrifughează puternic (eventual se filtrează de 2 ori). Se măsoară extincția la 546 *nm* față de apă bidistilată. Se folosesc eventual cuve cu grosimea de 2 *cm.* 3) Se diluează 0,4 *ml* de hemolizat cu 6,75 *ml* apă bidistilată. Această concentrație corespunde unei soluții 10% din hemolizatul de analizat. Se citește extincția la 546 *nm* față de apă bidistilată. Se utilizează eventual cuve cu drum optic de 2 *cm.*

Calcul. Dacă notăm cu E_p extincția obținută la punctul 2 și cu E_s extincția obținută la punctul 3 se utilizează formula următoare:

$$\% \text{ HbF} = \frac{E_p \cdot 100}{E_s \cdot 10} = \frac{E_p}{E_s} \cdot 10$$

Valori normale. La nou-născuți 50—80%.

La adulți 0,516 ± 0,118 sau după alți autori 0,24—0,75.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique théoretique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

Observații. Hemoglobina fetală poate fi dozată pe baza aceluiaș principiu al rezistenței față de denaturarea la alcalii folosindu-se însă măsurarea sub formă de oxihemoglobină (vezi pct. 4.2.2.).

Scanned with OKEN Scanner

În acest scop hematiile spălate de trei ori cu ser fiziologic se hemolizează amestecîndu-se un volum masă eritrocitară spălată cu un volum apă distilată şi 0,4 volume tetraclorură de carbon. După agitare timp de 5 *min.* şi centrifugare 20 *min.* la 3000 r.p.m. se filtrează supernatantul prin hîrtie Whatman N.1. umezită cu apă distilată. Se măsoară hemoglobina din filtrat ca oxihemoglobină (vezi pct. 4.2.2.) şi se ajustează concentraţia la aproximativ 10 *g*/100 *ml.* Se pipetează 0,2 *ml* din această soluţie de oxihemoglobină (filtrat 1) într-o eprubetă conţinînd 3,2 *ml* NaOH 0,083 *N.* se amestecă bine şi după exact 1 minut se adaugă 6,8 *ml* soluţie sulfat de amoniu (38 g $(NH_4)_2SO_4$ la 100 *ml* apă distilată şi 0,25 *ml* HCl 10 *N*). Se amestecă din nou şi după un alt minut se filtrează printr-o hîrtie de filtru densă (de ex. Whatman 42). Dacă acest filtrat (filtrat 2) are o nuanţă roz el conţine hemoglobină fetală (HbF). Se măsoară extincţia filtratului 2 la 540 *nm* faţă de apă distilată şi se compară cu extincţia dată de un amestec de 0,1 *ml* filtrat 1 cu 5 *ml* hidroxid de amoniu 1% (filtrat 1 diluat).

$$\frac{E \text{ filtrat } 2}{E \text{ filtrat } 1 \text{ diluat}} \times 100 = \%\text{HbF}$$

Creşterea procentului de HbF peste 4% din hemoglobina totală este semnificativă pentru hemoglobinopatia de tip F.

Electroforeza hemoglobinelor

Hemoglobinopatiile constituie un grup de boli caracterizate prin producerea unor forme moleculare anormale de hemoglobină determinate genetic. În unele cazuri, cum ar fi cele de hemoglobinemie fetală (HbF) din Talasemie (anemie de tip Cooley), anomalia poate fi detectată prin metode chimice cum ar fi rezistenţa la alcalii. În alte forme de hemoglobinopatii separarea electroforetică a hemoglobinelor patologice (hemoglobine S, C, D şi E) constituie principala metodă pentru detectarea anomaliei.

Astfel HbD şi HbC din anemia falcipară (Sickle cell trait) au o viteză de migrare electroforetică mai redusă decît hemoglobina normală a adultului (HbA). Dealtfel şi HbF migrează în urma HbA.

Separările electroforetice ale hemoglobinelor se fac pornindu-se de la hemolizatul de hematii, preparat prin amestecarea eritrocitelor spălate (1 volum) cu apă distilată (2 volume) şi toluen (1 volum). După centrifugare şi filtrare concentraţia hemoglobinei este ajustată la 1—3 g/100 *ml.*

Electroforeza pe hîrtie de filtru (vezi pag. 123) nu dă rezultate suficient de demonstrative în cazul hemoglobinelor, dar separări bune

Scanned with OKEN Scanner

se obţin în gel de amidon, folii de acetat de celuloză precum şi în gel de agaroză sau gel de agar. Pentru electroforeza în gel de agar vezi pag. 132 şi 193. În cazul separărilor electroforetice de hemoglobină se recomandă plăci de agar tamponate la *pH* 8,75 cu tampon tris-EDTA-acid boric iar compartimentele electrozilor vor conţine tampon barbituric *pH* 8,6 cu o tărie ionică de 0,025. Se recomandă de asemeni o răcire a plăcilor de agar în cursul electroforezei care se efectuează la 175 volţi timp de 20—30 minute.

Benzile de hemoglobină din proba de analizat, evidenţiate prin culoarea lor roşie sînt comparate cu probe de control, conţinînd un amestec de hemoglobine cunoscute (HbA, HbF, HbS etc.) supuse la electroforeză în paralel. Plăcile de agar pot fi apoi fixate, uscate şi colorate cu un colorant al proteinelor, iar fracţiunile de hemoglobină pot fi apreciate cantitativ prin densitometrie.

Pentru detalii privind electroforeza hemoglobinelor patologice, recomandăm lucrarea lui Scheena şi colab. (Scheena, A. H., Fox, F. F., Bayha, M., Sterens, K. M., Am. J. Clin. Path. 50(1968) p. 142.

4.7. | Determinarea bilirubinei

Pentru dozarea bilirubinei dispunem astăzi de metoda spectrofotometrică directă (aplicabilă numai la nou-născut) şi de diferitele variante ale tehnicii diazo.

Standardizarea metodelor de dozare a bilirubinei este îngreunată de faptul că puritatea preparatelor comerciale de bilirubină oscilează între 70—100%. De aceea, înainte de a se prepara o soluţie standard de bilirubină trebuie determinată puritatea. În lipsa unor criterii absolute de puritate se utilizează cel mai frecvent coeficientul molar de extincţie în cloroform, a cărui valoare este cuprinsă între 55.000—60.400, după diferiţi autori (1). După alegerea coeficientului molar de extincţie rezultă diferenţe pînă la 10%. Mai raţională pare luarea în considerare, după Henry (2), a unei greutăţi moleculare de 584 şi a unui coeficient molar de extincţie de 60.100 pentru produsul pur. Aceasta permite o standardizare a metodelor de dozare a bilirubinei, deşi se aduc obiecţii ca: labilitatea standardului în cloroform, ori faptul că unele bilirubine sînt puţin solubile în cloroform.

Determinarea purităţii bilirubinei. Toate preparatele de bilirubină trebuie conservate în exicator la 4°C, ferite de lumină. Dacă produsele nu sînt păstrate la sec, umiditatea poate atinge 3%.

Se cîntăresc rapid, în semi-obscuritate, 10 *mg* bilirubină şi se dizolvă în cloroform pro analysi, după care se aduce volumul total la 100 *ml*, cu cloroform. Soluţia este stabilă maximum o oră şi trebuie

Scanned with OKEN Scanner

ferită de lumină în acest interval. Din această soluţie se iau 10 *ml* şi se adaugă cloroform pînă la 100 *ml*. Imediat după aceea se măsoară extincţia la 453 *nm* ori la 436 *nm*. Dacă este posibil se va trasa spectrul între 360—520 *nm*.

Spectrul de absorbţie al bilirubinei în cloroform prezintă un maxim la 453 *nm* (fig. 47). Avînd greutatea moleculară 584,65 pentru soluţia cu concentraţia de 1 *mg*/100 *ml* şi coeficientul molar de extincţie $\varepsilon^{b(CHCl_3)}_{453nm} = 60.100$ se poate calcula extincţia teoretică de 1,030 pentru o puritate de 100%. Notînd cu E^{obs}_{453nm} extincţia observată avem formula de calcul a purităţii:

$$\text{puritate în } \% = \frac{E^{obs}_{453} \cdot 100}{1{,}03} = E^{obs}_{453} \cdot 97$$

Pentru 436 *nm* (corespunzător liniei mercurului), la care coeficientul molar de extincţie este 56.800, iar extincţia teoretică este 0,972, avem:

$$\text{puritate } (\%) = E^{obs}_{436nm} \cdot 103$$

4.7.1. | PREPARAREA SOLUŢIEI STANDARD DE BILIRUBINĂ

Pentru determinarea spectrofotometrică directă în plasmă, nu se poate utiliza soluţia în cloroform, deoarece în plasmă, ser sau în diverse soluţii de proteine, maximul de extincţie al bilirubinei se află la 463 *nm* în loc de 453 *nm*, iar coeficientul molar de extincţie este mai mic (80—97%) faţă de valoarea celui obţinut cu soluţiile le bilirubină în cloroform. De aceea ca dizolvant la prepararea soluţiei standard se pot utiliza: 1) o soluţie de albumină umană (10%); 2) un ser standard comercial fără bilirubină; 3) un ser lipsit de bilirubină prin expunerea la lumina solară.

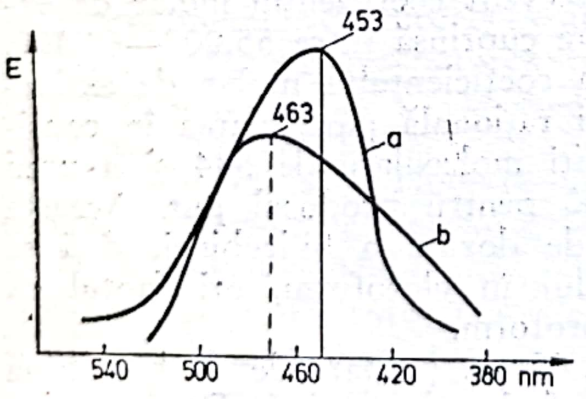


Fig. 32. Spectrul de absorbţie al bilirubinei în soluţie cloroformică (a) şi în soluţie de albumină (b); pe abscisă lungimea de undă (λ) în *nm*, pe ordonată extincţia.

Pentru prepararea unei soluţii standard de bilirubină de 20 *mg*/100 *ml* se procedează în felul următor: se cîntăresc 20 *mg* bilirubină şi se dizolvă în 10 *ml* soluţie de carbonat de sodiu 1%, la întuneric,

cu agitare cît mai mică, pentru a evita formarea spumei. Se adaugă 1 *ml* din această soluţie la 8 *ml* dizolvant (soluţie de albumină 10% sau ser fără bilirubină) şi se adaugă 1 *ml* acid acetic 0,1 *N*.

4.7.2. DETERMINAREA BILIRUBINEI PLASMATICE LA NOU-NĂSCUŢI PRIN SPECTROFOTOMETRIE DIRECTĂ

Dat fiind că bilirubina prezintă o culoare galbenă intensă determinarea concentraţiei bilirubinei se poate efectua măsurînd intensitatea culorii plasmei.

Aceste metode nu dau rezultate satisfăcătoare la adulţi, la care doar 70% din coloraţia galbenă a plasmei este produsă de bilirubină, 20% de carotinoide, iar 10% de alţi lipocromi. La nou-născuţi în prima săptămînă de viaţă, carotinoidele lipsesc ori sînt prezente doar în cantităţi sub 0,1 *mg*/100 *ml*, deci coloraţia galbenă a plasmei se datorează aproape în exclusivitate prezenţei bilirubinei.

Condiţia esenţială pentru executarea metodei este de a avea un spectrofotometru cu putere de rezoluţie mare sau un fotometru cu linii spectrale (cu lampă de mercur).

Principiu. Se diluează plasma cu soluţia tampon şi se măsoară extincţiile la 453 *nm* (unde absoarbe bilirubina şi hemoglobina şi la 575 *nm* (unde absoarbe doar hemoglobina). Avînd coeficienţii molari de extincţie a acestor substanţe se poate calcula concentraţia în bilirubină pe baza diferenţei celor două extincţii. De fapt, cu $E_{453\ nm}$ se calculează suma concentraţiei bilirubinei şi hemoglobinei luînd în considerare o constantă determinată experimental, iar cu $E_{575\ nm}$ se determină concentraţia hemoglobinei şi se face diferenţa. În cazul folosirii unui fotometru cu linii spectrale se măsoară extincţiile la cele două linii ale mercurului de 436 şi 578 *nm*.

Reactivi. 1) Tampon fosfat, *pH* 7,4; 0,05 *g* fosfat disodic (Na_2HPO_4) şi 1,74 *g* fosfat monopotasic (KH_2PO_4) se dizolvă în apă bidistilată, apoi se aduce volumul la 1000 *ml*. Se încearcă *pH*-ul. 2) Tampon fosfat, *pH* 5,0: 27,6 *g* fosfat monosodic ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) se dizolvă în cca 700 *ml* apă bidistilată şi se aduce *pH*-ul la 5,0 cu NaOH 5 *N*. Se aduce volumul la 1000 *ml* cu apă. 3) Acetat de etil ($CH_3COOC_2H_5$).

Tehnica. Sîngele se recoltează în tuburi de sticlă heparinate (vezi cap. de ultramicroanaliză), se centrifughează pentru separarea plasmei.

Pentru determinarea bilirubinei totale: se pun 20 *µl* plasmă în cuva spectrofotometrului peste 1,0 *ml* tampon fosfat, *pH* 7,4, şi se citesc extincţiile la 453 şi 575 *nm* faţă de tampon, în cuvă de 1 *cm*.

Calcul: mg bilirubină/100 *ml* = $(E_{453\ nm} - E_{575\ nm}) \cdot F_T$

Scanned with OKEN Scanner

F_T se determină pentru fiecare aparat, din absorbţia unei soluţii standard de bilirubină şi este cuprins între 60—70.

În cazul fotometrului cu linii spectrale se măsoară extincţiile la 436 şi 578 *nm*.

Calcul. mg bilirubină/100 *ml* = $87 \cdot E_{436\ nm} - 197 \cdot E_{578\ nm}$

Pentru determinarea bilirubinei neconjugate: într-un microextractor cu dop rodat se pun 20 *µl* ser peste 0,16 *ml* tampon fosfat, *pH* 5,0, apoi se adaugă 0,5 *ml* acetat de etil şi se scutură foarte puternic de 3 ori cîte 30 secunde. Se aspiră cu o pipetă Pasteur stratul de acetat de etil şi se citeşte la 455 şi 575 *nm*, în microcuvă de 1 *cm*, faţă de acetat de etil.

Calcul. mg bilirubină neconjugată/100 *ml* = $(E_{455nm} - E_{575nm}) \cdot F_L$

F_L este în jur de 25—30.

Observaţii

1. Se va utiliza numai plasmă şi nu ser, fiindcă la prelevarea serului se produce întotdeauna o uşoară hemoliză.

2. Dacă apare o turbiditate se poate folosi tamponul tris 50 *mM*, *pH* 7,4, în locul celui fosfat.

3. În prima săptămînă de viaţă se poate socoti metoda ca specifică pentru bilirubină. După această dată se obţin valori prea mari.

4. Pentru determinarea constantelor la 436 *nm* şi 578 *nm* indicaţiile sînt date în referinţa 4 de la bibliografie.

5. Metoda poate fi eventual modificată pentru fotometrele cu lumină nemonocromatică; indicaţiile pentru etalonare se află în referinţa 5.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie Clinique théorique et pratique*, Ed. Doin, Paris, 1967. Henry, R. J., Jacobs, S. L., Chiamori, N., Clin, Chem., 6, 1960, 529; White, D., Haidar, G. A., Reinhold, J. G., Clin. Chem., 4, 1958, 211. Richterich, R., Klin. Wschr., 1963, *41*, 778.; Meites, S., Faulkner, W. R., *Manual of Practical Micro and General Procedures in Clinical Chemistry*, Thomas, Springfield, III. 1962.; O'Brien, D., Ibbott, F. A., *Laboratory Manual of Pediatric Micro and Ultramicro-Biochemical Techniques*, Harper & Row, 1962.

4.7.3. DETERMINAREA BILIRUBINEI DIRECTE ŞI A CELEI TOTALE PRIN REACŢIA DE DIAZOTARE

Bilirubina se poate găsi în plasmă sub trei forme: liberă (neconjugată), mono- şi diglicuronid (ultimele două forme reprezentînd bilirubina conjugată). Diferenţierea monoglicuronidului de diglicuronid ne-

cesită metode cromatografice care sînt dificil de utilizat. În laboratorul clinic se dozează bilirubina totală şi bilirubina liberă (neconjugată) iar diferenţa între aceste două valori reprezintă bilirubina conjugată (mono şi diglicuronid).

Bilirubina conjugată care e hidrosolubilă reacţionează cu acidul sulfanilic diazotat (reactiv diazo) formînd un complex colorat azobilirubina care la un *pH* alcalin este albastru iar în mediu acid sau neutru este roşu.

Bilirubina liberă (neconjugată) nu este hidrosolubilă şi este menţinută în soluţie apoasă (ser sau plasmă) prin fixarea pe albumină. Această bilirubină nu reacţionează direct cu reactivul diazo ci doar în prezenţa de alcooli sau de diverşi „acceleratori" (cofeină, uree, benzoat de sodiu, antipirină, piridină, acetamidă etc.). După tratarea cu astfel de acceleratori se produce reacţia de culoare care, evident, în astfel de condiţii e dată şi de bilirubina conjugată şi de cea neconjugată (bilirubina totală).

Bilirubina liberă (neconjugată) care nu reacţionează direct cu reactivul diazo se numeşte şi *bilirubină indirectă*, spre deosebire de bilirubina conjugată care poate fi considerată ca o *bilirubină directă.*

Numeroasele metode de dozare a bilirubinei diferă între ele în funcţie de agentul accelerator al reacţiei de diazotare al bilirubinei indirecte şi în funcţie de valoarea de *pH* la care se dezvoltă reacţia de culoare. Vom descrie mai jos deci două astfel de metode: metoda Malloy şi Evelyn utilizînd ca accelerator metanolul şi metoda Jendrassik—Grof utilizînd cofeină, acetat şi benzoat de sodiu.

4.7.3.1. VARIANTA CU METANOL (MALLOY ŞI EVELYN MODIFICATĂ)

Principiu. O soluţie de acid sulfanilic în acid clorhidric diluat tratată cu o soluţie de nitrit de sodiu va forma acid nitros (HNO_2) care duce la formarea de acid sulfanilic diazotat (reactiv diazo). Bilirubina conjugată, hidrosolubilă, reacţionează cu acest compus şi formează azobilirubina care, în absenţa de alcalii, dă o coloraţie purpurie. Tratarea cu metanol a serului de analizat permite şi reacţia bilirubinei indirecte (libere, neconjugate) cu reactivul diazo iar culoarea finală este proporţională cu bilirubina totală (directă şi indirectă).

Reactivi. 1) Acid sulfanilic, 5 *g*, se dizolvă în 60 *ml* HCl concentrat p.a. şi se aduce volumul la 1000 *ml*. 2) Nitrit de sodiu 2% în apă distilată. Se păstrează la +4°C. 3) Reactiv Diazo. Se prepară înainte de utilizare prin amestecarea a 10 *ml* reactiv 1 cu 0,3 *ml* reactiv 2. 4) Probă în alb pentru reactivul Diazo: 60 *ml* HCl concentrat

Scanned with OKEN Scanner

se diluează la 1000 *ml* cu apă distilată. 5) Alcool metilic p.a. 6) Standard de bilirubină. Se cîntăresc 20 *mg* bilirubină pură şi se dizolvă în 2 *ml* NaOH 0,1 *N*, şi se aduce volumul la 100 *ml* cu albumină umană 5% sau cu un ser uman clar şi neicteric sau mai bine ser uman lipsit de bilirubină (prin expunere la lumină solară). Pentru a se evita folosirea unor volume mari de ser diluant se poate efectua o diluare în două trepte. La cei doi mililitri de NaOH 0,1 *N*, conţinînd 20 *mg* bilirubină, se adaugă 8 *ml* ser diluant. Se ia apoi 1 *ml* din această soluţie şi se completează la 10 *ml* cu ser diluant. Această soluţie va conţine 20 *mg* bilirubină la 100 *ml*.

Tehnica. Se amestecă 0,5 *ml* ser proaspăt nehemolizat de analizat cu 9,5 *ml* apă distilată. Din acest amestec se scot 5 *ml* şi se trec în altă eprubetă. Se obţin astfel 2 eprubete (probă şi probă în alb) conţinînd cîte 5 *ml* ser diluat). La probă se adaugă 1 *ml* reactiv Diazo (reactiv 3) iar la proba în alb se adaugă 1 *ml* reactiv 4. Se amestecă bine conţinutul eprubetelor. După 2 minute se citeşte extincţia probei faţă de proba în alb la 560 *nm*, în cuvă de 1 *cm*. Se interpolează valoarea extincţiei la curba de calibrare, iar rezultatul se împarte la 2, obţinînud-se concentraţia *bilirubinei conjugate* (directe) în *mg*/100 *ml*. Lichidele din cuve se trec înapoi în eprubete şi se adaugă în continuare 6 *ml* metanol iar după 10 minute se citesc din nou extincţiile în aceleaşi condiţii. Valoarea *bilirubinei totale* se obţine de data aceasta direct din curba de calibrare fără a se mai împărţi la 2.

Pregătirea curbei de calibrare. Se iau 6 eprubete şi se numerotează. În prima eprubetă (proba în alb) se pipetează 1 *ml* ser diluant. În eprubeta nr. 2 se amestecă 1 *ml* ser diluant cu 1 *ml* soluţie standard de bilirubină (reactiv 6). În eprubeta nr. 3 se amestecă 3 *ml* ser diluant cu 1 *ml* reactiv 6. În eprubeta nr. 4 se amestecă 1 *ml* din conţinutul eprubetei nr. 2 şi 1 *ml* din conţinutul eprubetei nr. 3. În eprubeta nr. 5 se amestecă 1 *ml* ser diluant cu 1 *ml* din conţinutul eprubetei nr. 3. În eprubeta nr. 6 se amestecă 1 *ml* ser diluant cu 1 *ml* din conţinutul eprubetei nr. 5. Concentraţiile de bilirubină în eprubetele 2—6 vor fi respectiv 10; 5; 7,5; 2,5 şi 1,25 *mg* la 100 *ml*.

Se scot apoi cîte 0,5 *ml* din conţinutul fiecărei eprubete şi se trec într-un alt şir de 6 eprubete, diluîndu-se cu 9,5 *ml* apă distilată. Se transferă cîte 5 *ml* din fiecare diluţie în alte 6 eprubete şi se adaugă 1 *ml* reactiv Diazo proaspăt preparat, se amestecă şi se adaugă 6 *ml* metanol, amestecîndu-se din nou. După 10 minute se citesc extincţiile la 560 *nm* faţă de prima eprubetă (serul diluant). În acest fel se elimină extincţia pe care ar putea-o da urmele de bilirubină din serul diluant. Se trasează curba de calibrare trecîndu-se pe abscisă concentraţiile de bilirubină iar pe ordonată extincţiile obţinute. Curba trebuie să treacă prin origine.

Scanned with OKEN Scanner

Observații. Se poate lucra cu cantități mai mici de ser (de ex. 0,1 *ml*) reducîndu-se în mod corespunzător volumele reactivilor.

Pentru dozarea bilirubinei în bilă (se găsește doar bilirubină conjugată) produsul se va dilua de 10 ori.

BIBLIOGRAFIE

Malloy, H. T., Evelyn, K. A., J. Biol. Chem., 119, 1937, p. 481; Meites, S., Hogg, C. K., Clin. Chem., 5, 1959, 470.

4.7.3.2. METODA JENDRASSIK—GROF, MODIFICATĂ (CU COFEINĂ, ACETAT ȘI BENZOAT DE Na)

Principiul este tot cel al reacției Diazo, însă se adaugă și soluție Fehling II alcalină, astfel încît în soluția alcalină azobilirubina devine albastră, putîndu-se măsura selectiv la 578 *nm*, chiar în prezența unor produși secundari galbeni (bilirubina se determină în absență de alcalii la 546 sau 560 *nm* ca un colorant roșu).

Reactivi. 1) Acid sulfanilic $2{,}9 \cdot 10^{-2} M$, acid clorhidric 0,17 *N*: 5 g acid sulfanilic se dizolvă în apă, se adaugă 15 *ml* HCl conc. și apă ad 1000 *ml*. 2) Soluție de nitrit de sodiu $7{,}2 \cdot 10^{-2} M$: 0,5 g în 100 *ml* apă bidistilată. Se păstrează în frigider o lună. *3*) Accelerator: a) cofeină $1{,}3 \cdot 10^{-1} M$, benzoat de Na $1{,}56 \cdot 10^{-1} M$: se dizolvă 10 g cofeină și 15 g benzoat de Na în 100 *ml apă*. b) Acetat de Na 25% în apă distilată. Acceleratorul se prepară extemporaneu prin amestecare în volume egale a soluțiilor a și b. *4*) Soluția Fehling II: tartrat de Na și K $9{,}3 \cdot 10^{-1}$ *M*, NaOH 1,9 *N*: se dizolvă 150 *g* sare Seignette în aproximativ 600 *ml* apă, se adaugă 300 *ml* soluție NaOH 25% și se completează cu apă la 1000 *ml*.

Modul de lucru. 1) Determinarea bilirubinei totale: se pregătesc două eprubete (proba și martorul) în felul următor:

	Proba	Martor
Acid sulfanilic *(ml)*	0,2	0,2
Nitrit de Na *(ml)*	0,02	—
Accelerator *(ml)*	1,0	1,0
Ser *(ml)*	0,2	0,2

Se agită eprubetele, se lasă 10—60 minute la temperatura camerei (20—30°C), apoi se adaugă:

Sol. Fehling II *(ml)*	1,0	1,0

Scanned with OKEN Scanner

Se agită şi după 5—30 minute se citesc extincţiile faţă de apă distilată, în cuvă de 1 *cm* la 578 *nm*.

Dacă extincţia este peste 1, se va dilua serul 1 p. ser + 4 p. sol. salină fiziologică, iar în final rezultatul se multiplică cu 5.

Calcul. Se poate proceda în două feluri: 1) Cu ajutorul unor factori de calcul (F_1 pentru bilirubina totală şi F_2 pentru cea directă) determinaţi pe baza unei curbe de etalonare, ori luînd pentru aceştia valorile de 11,3 şi respectiv 14,6, date în literatură.

$$mg \text{ bilirubină totală}/100\ ml = (E_{\text{probă}} - E_{\text{martor}}) \cdot F_1$$

2) Determinarea bilirubinei directe (conjugată):

	Proba	Martor
Acid sulfanilic *(ml)*	0,2	0,2
Nitrit de Na *(ml)*	0,02	—
Sol. salină fiziologică *(ml)*	2,0	2,0
Ser *(ml)*	0,2	0,2

Se agită, se lasă la temperatura camerei exact 5 minute, apoi se citeşte extincţia faţă de martor, la 546 *nm*, în cuvă de 1 *cm*.

Calcul.

$$mg \text{ bilirubină directă}/100\ ml = (E_{\text{probă}} - E_{\text{martor}}) \cdot F_2$$

3) Determinarea factorilor de calcul F_1 şi F_2. Se prepară o soluţie de bilirubină 10 *mg*/100 *ml*: se cîntăresc 10 *mg* bilirubină, 10 *mg* acid ascorbic, se adaugă NaOH 0,1 *N* q.s. pentru a se dizolva (cca 3 *ml*), apoi ser fără bilirubină sau albumină serică umană 5% ad 100 *ml*.

Se fac următoarele probe:

Nr. eprubetei:	1	2	3	4	5	6	7	8
Sol. bilirubină 10 *mg%* *(ml)*	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	2,0	2,5	2,0
Ser uman normal *(ml)*	4,5	2	2,25	1,5	1,0	1,25	1,0	0,5
Bilirubină *(mg%)*	1	2	3	4	5	6	7	8

La fiecare diluţie astfel preparată se determină bilirubina totală şi directă (conjugată), aşa cum s-a arătat mai sus, şi se trasează curba de etalonare a aparatului. Din curbă se pot calcula factorii F_1 pentru bilirubina totală şi F_2 pentru bilirubina directă după formulele:

$$F = \frac{mg \text{ bilirubină}}{E}$$

Practic se adună extincţiile probelor 1—8 şi cantitatea în mili grame din acestea şi se face raportul de mai sus.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Jendrassik, L., Grof, P., Biochem. Z, 297, 1938, 81; Schellung, G., Wende, U., Arch. Kinderheilk, 162, 1960; Prospect „Merckotest"-Bilirubin; Devaux, G., Crockett, R., Jouzier, E., Brachet—Liermain, A., Ruffie, A.; Choix de technique de biochimie clinique, Gauthier—Villars, Paris, 1970.

4.7.4. | INTERPRETAREA MODIFICĂRILOR BILIRUBINEI SERICE

Bilirubina liberă (neconjugată sau indirectă) este produsă în SRE prin degradarea hemoglobinei și este vehiculată prin plasmă, legată de albumina serică. La nivelul ficatului bilirubina neconjugată este desprinsă de albumină și după ce pătrunde în hepatocite este conjugată cu acidul glicuronic sub acțiunea unei glicuronil transferaze, aflate în microsomi, și devine astfel hidrosolubilă (bilirubină conjugată sau directă) fiind apoi excretată prin bilă. Din acest motiv, bilirubina liberă (neconjugată sau indirectă) se mai numește și bilirubină prehepatică sau premicrosomală iar bilirubina conjugată (directă) se poate întîlni și sub denumirea de bilirubină posthepatică sau mai precis postmicrosomală.

Valorile normale sînt de pînă la 1 *mg*/100 *ml* pentru bilirubina totală și sub 0,25 *mg*/100 *ml* pentru bilirubina conjugată (directă). Bilirubina indirectă se obține din diferența între valorile bilirubinei totale și a bilirubinei directe.

La nou-născuți (limita superioară)	Născuți la termen (bilirubină totală :	Prematuri *mg*/100 *ml*)
0—24 ore	5,0	8,0
24—48 ore	9,0	12,0
3,5 zile	12,0	24,0
după 1 lună	1,5	1,5

Modificări patologice. Bilirubina liberă (neconjugată, indirectă, prehepatică, premicrosomală) crește în icterele hemolitice sau în defectele enzimatice cu caracter familial în procesul de transformare a bilirubinei libere în bilirubină conjugată (boala lui Gilbert, sindrom Crigler—Najjar). Bilirubina neconjugată nu se elimină prin urină.

Bilirubina conjugată (directă, posthepatică sau postmicrosomală) crește în icterele mecanice și în unele cazuri rare, cu defecte familiale în procesul de excreție al bilirubinei conjugate (sindrom Sprinz—Nelson—Dubin—Johnson). Bilirubina conjugată, hidrosolubilă se elimină prin urină. În hepatite și ciroze se constată atît creșteri ale bilirubinei directe cît și a celei indirecte.

Scanned with OKEN Scanner

În bilă valorile bilirubinei sînt de 5—10 *mg*/100 *ml* în bila A, 15—30 *mg*/100 *ml* în bila B şi 2—4 *mg*/100 *ml* în bila C.

Concentraţia bilirubinei în bilă creşte în caz de stază biliară şi uneori în icterele hemolitice, scăzînd în icterele hepatocelulare şi mai ales în cele mecanice.

BIBLIOGRAFIE

Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., Inwood, M. J. H., *Medical laboratory Technology and clinical Pathology*, Ed. W. B. Saunders, Philadelphia—London—Toronto, 1969.

5. LIPIDELE SERICE

5.1. Determinarea lipidelor totale

5.1.1. METODA GRAVIMETRICĂ SPERRY

Principiu. Lipidele extrase în metanol şi cloroform se purifică de substanţele contaminante şi se cîntăresc.

Reactivi. 1) Metanol. 2) Cloroform. 3) Hîrtie de filtru cantitativă, degresată prin extracţie repetată cu alcool fierbinte. 4) $CaCl_2$ 0,02%. 5) Soluţie de spălare, 96,3 *ml* amestec cloroform — metanol (cloroform 2 volume, metanol 1 volum) şi 23,7 *ml* soluţie $CaCl_2$ 0,02% (4) se amestecă într-o pîlnie de separare şi se lasă să stea pînă cînd cele două faze se separă, cea superioară fiind perfect clară. Faza inferioară organică se îndepărtează. Soluţia apoasă rămasă se utilizează pentru spălarea extractului lipidic. Ea are aproximativ aceeaşi concentraţie de solvent ca şi faza apoasă obţinută în cursul procesului de purificare a extractului de lipide (vezi mai jos).

Tehnica

a) Extracţia. Un *ml* ser se adaugă picătură cu picătură într-un balon cotat de 25 *ml*, conţinînd 8,3 *ml* metanol, agitîndu-se mereu. Se adaugă 8,3 *ml* de cloroform (2) şi se aduce la fierbere timp de cîteva secunde. După răcire se adaugă cloroform pînă la semn şi se amestecă bine (e bine ca dopul rodat să fie umezit cu apă înainte de închidere spre a se evita pierderile de solvent şi de lipide care s-ar putea înfiltra pe lîngă dop în cursul amestecării). Se filtrează apoi cît mai rapid prin hîrtie de filtru cantitativă (3), care, în prealabil, a fost degresată prin extracţie cu alcool fierbinte, colectîndu-se filtratul într-un Erlenmeyer de 50 *ml*.

b) Purificarea. 20 *ml* din extractul clar se trec într-un cilindru gradat de 25 *ml*, cu dop rodat. Se adaugă 4 *ml* apă şi se închide cu

Scanned with OKEN Scanner

dopul, care în prealabil a fost umezit cu apă. Se agită bine timp de 1 minut. Cilindrul bine închis se lasă să stea peste noapte, aşa ca cele două faze să se separe bine. Faza apoasă superioară se îndepărtează cît mai complet avîndu-se grije să nu se ia şi din faza organică. La faza organică din cilindrul gradat se adaugă 3 *ml* din soluţia apoasă de spălare (5), aşa încît să se spele bine pereţii cilindrului, avîndu-se însă grijă ca cele două faze să nu se amestece. Se rotează doar cilindrul în poziţie verticală pentru a se amesteca reziduul apos de la suprafaţă cu lichidul de spălare. Se îndepărtează apoi cu grije soluţia de spălare. Se repetă spălarea încă de două ori.

c) Evaporarea şi cîntărirea. Se adaugă la cilindru 2 *ml* de metanol, se amestecă conţinutul şi apoi soluţia clară se transferă într-un balon Erlenmeyer de 50 *ml*. Cilindrul şi dopul se spală cu cloroform — metanol (2 : 1), care se trece de asemenea în balonul Erlenmeyer. Dată fiind mica cantitate de apă din extractul lipidic purificat, nu este nevoie de evaporare în vid. Evaporarea se poate realiza prin încălzirea vasului la 35—40°C şi trecerea unui curent de azot sau de CO_2, printr-un tub subţire de sticlă, fixat la aproximativ 5 *mm* deasupra suprafeţei soluţiei. După uscare, lipidele se redizolvă în 3—4 *ml* cloroform — metanol (2 : 1) şi se filtrează într-un balon cotat de 5 *ml*, degresat şi în prealabil cîntărit. Se va avea grijă să se spele cu solvent pereţii vasului Erlenmeyer şi hîrtia de filtru pentru o dizolvare cît mai completă a lipidelor. Se evaporează apoi din nou, aşa cum s-a arătat mai sus şi se curăţă cu grijă exteriorul balonului. Eventual se aşază într-un exicator evacuat la vid şi în care se introduce azot. Exicatorul se evacuează apoi din nou la vid. Operaţia se poate repeta. Se cîntăreşte din nou. Greutatea obţinută, înmulţită cu 125, dă cantitatea de lipide în *mg* la 100 *ml*.

BIBLIOGRAFIE

Sperry, W. M., *Lipid Analysis* in *Methods of Biochemical Analysis*, vol. II, (Ed. D. Glick), Interscience Publishers, New York, 1955, p. 83.

5.1.2. | METODA COLORIMETRICĂ ZÖLLNER ŞI KIRSCH

Se bazează pe reacţia de culoare a sulfofosfovanilinei (S.P.V.) cu dublele legături din structura lipoizilor plasmatici.

Reactivi. 1) Acid sulfuric concentrat p.a. (densitate 1,84). 2) Acid fosforic p.a. 85% (densitate 1,7). 3) Vanilină (Merck D. A. B.) 0,6 g% în apă distilată. 4) Reactiv acid fosforic-vanilină (4 volume acid fosforic şi un volum soluţie de vanilină se amestecă cu grijă. Se păstrează în sticlă brună timp de 10—14 zile la temperatura came-

Scanned with OKEN Scanner

rei, după care reactivul trebuie reînnoit). 5) Soluţie standard de trioleină (1 g trioleină, cîntărită la balanţa analitică, se dizolvă în 100 *ml* cloroform). Această soluţie se diluează de 100 ori cu cloroform ajungîndu-se la o concentraţie de 10 *mg%* sau 100 µg/*ml*.

Tehnica. Cu o micropipetă se pipetează 5 µ*l* ser într-o eprubetă de 10 *ml*. Se adaugă 0,2 *ml* acid sulfuric concentrat (1) avîndu-se grijă să se spele de pe pereţii eprubetei eventualele urme de ser. Se încălzeşte apoi 10 minute pe baia de apă fierbinte şi se răceşte la temperatura camerei. Se adaugă apoi 5 *ml* reactiv fosfovanilic (4) de preferinţă dintr-o biuretă, urmărindu-se cu atenţie curgerea reactivului vîscos. Se amestecă imediat cu o baghetă de sticlă lăţită la capăt. Se dezvoltă o coloraţie roz, iar după 30—50 minute se citeşte extincţia la 530 *nm* în cuva de 1 *cm*, faţă de apă distilată sau mai bine faţă de o probă în alb alcătuită din reactivii (1) şi (4), în proporţiile prescrise.

Trasarea curbei de calibrare. Se face luînd din soluţia standard diluată cîte 1 *ml*, 0,8 *ml*, 0,5 *ml* şi 0,25 *ml*, corespunzînd respectiv la 100, 80, 50 şi 25 µg trioleină. Se încălzesc eprubetele pe baia de apă pînă la îndepărtarea completă a solventului. Se efectuează apoi reacţia sulfofosfovanilinei. E bine ca citirea extincţiilor să se facă faţă de o

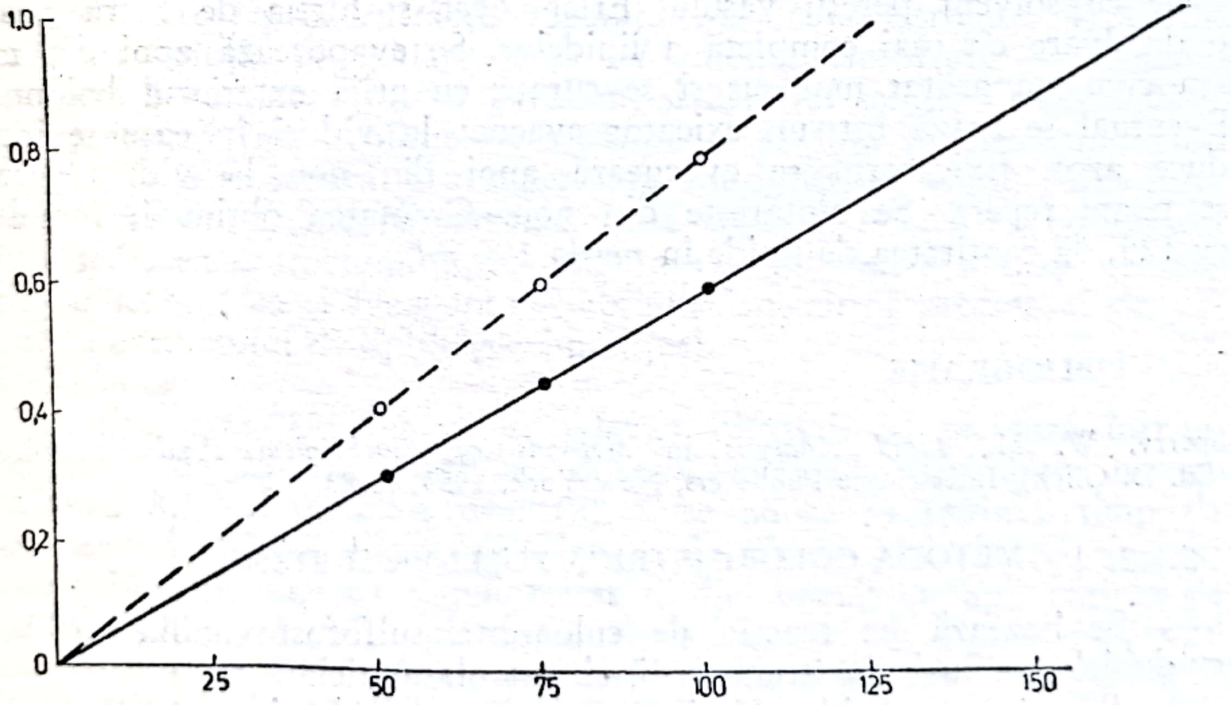


Fig. 33. Curba de calibrare pentru dozarea lipidelor totale după metoda Zöllner şi Kirsch; pe abscisă µg trioleină, pe ordonată extincţia. Linia ntreruptă, relaţia între extincţie şi cantitatea de trioleină din probă. Linia plină, relaţia dintre extincţia şi lipidele totale din ser (µg/5 µl ser). Extincţia dată de trioleină se înmulţeşte cu 0,760, obţinîndu-se astfel corespondenţa între extincţie şi lipidele totale.

probă în alb preparată din solventul pur (cloroform) fără trioleină, evaporat la sec și tratat în același mod ca și diluțiile de trioleină folosite pentru calibrare.

Deoarece trioleina are în structura ei mai multe duble legături decît lipoizii serici, ea va da o reacție de culoare mai intensă decît o aceeași cantitate de lipide serice măsurată gravimetric.

Zöllner și Kirsch au stabilit că valorile extincțiilor obținute cu diferite concentrații de trioleină pot fi corectate prin înmulțirea cu factorul 0,76 ajungîndu-se astfel la valori de extincție aplicabile pentru măsurarea lipoizilor serici (vezi fig. nr. 33).

Calcul. Valorile obținute din curba corectată corespund la μg lipide pe 5 *μl* ser. Înmulțindu-se această valoare cu 20 se obțin valorile în *mg* lipide totale la 100 *ml* ser. Întrucît apa din ser inhibă într-o oarecare măsură reacția de culoare, se recomandă ca valorile să fie înmulțite cu factorul de corecție 1,1.

Observație. În lipsa unor micropipete reacția se poate efectua și cu 20 *μl* ser (pipetă de hemoglobină), diluîndu-se în prealabil serul cu ser fiziologic (1 parte ser + 3 părți ser fiziologic). În acest caz factorul de corecție (inhibiția produsă de apă) este de 1,2.

BIBLIOGRAFIE

Zöllner, N., Kirsch, K., Ztschr. Ges. exp. Med., 1962, *135*, 545.

5.1.3. | METODA COLORIMETRICĂ SIMPLIFICATĂ

Principiul este același ca și în metoda precedentă.

Reactivi. Aceiași ca în metoda descrisă anterior cu excepția că standardul se obține prin dizolvarea a 760 *mg* trioleină în 100 *ml* alcool absolut. Această concentrație de trioleină produce o reacție de culoare de aceiași intensitate ca și cea dată de lipidele serice în concentrație de 1000 *mg*/100 *ml*. Ca standard mai poate fi folosită și o soluție de colesterol 1000 *mg*/100 *ml* în alcool absolut.

Tehnica. Se pipetează 0,05 *ml* (50 μl) ser de analizat într-o eprubetă adăugîndu-se apoi 2 *ml* acid sulfuric concentrat. Se prepară o probă în alb conținînd 0,05 *ml* apă distilată și 2 *ml* acid sulfuric și un standard conținînd 0,05 *ml* soluție standard și 2 *ml* acid sulfuric. Se fierbe pe baie de apă timp de 10 minute și se lasă apoi să se răcească. Se pipetează apoi cîte 0,1 *ml* (100 μl) din proba de analizat, din proba în alb și din standard în cîte o eprubetă la care se adaugă 2 *ml* reactiv vanilină acid fosforic. Se dezvoltă o coloratie roz care se fotometrează față de proba în alb la 530 *nm*, după 30—50 de minute.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul. Lipide totale ($mg/100\ ml$) $= \frac{\text{Extincţia probei} \times 1\,000}{\text{Extincţia standardului}}$

Observaţii. În condiţiile de mai sus nu e nevoie de a efectua nici o corecţie.

5.2. Determinarea colesterolului total

5.2.1. METODA WATSON

Se bazează pe reacţia de culoare a colesterolului în prezenţă de anhidridă acetică şi acid sulfuric (reacţia Lieberman). Complexul colorat este stabilizat cu acid 2-5 dimetilbenzensulfonic.

Reactivi. 1) Acid 2-5-dimetilbenzensulfonic 0,25 *M* (5,55 *g* în 100 *ml* acid acetic glacial). 2) Reactiv de culoare: o parte reactiv 1+3 părţi anhidridă acetică. Se poate păstra trei luni de zile. 3) Acid acetic glacial, tratat cu perhidrol (10 *ml* perhidrol + 90 *ml* acid acetic glacial); dacă acidul acetic este p.a. nu este nevoie să fie tratat cu perhidrol. 4) Acid sulfuric concentrat. 5) Standard de colesterol 200 $mg\%$ în acid acetic glacial.

Tehnica. Se iau 0,2 *ml* ser la care se adaugă 0,2 *ml* acid acetic glacial (3) şi 5 *ml* reactiv de culoare (2). Se lasă 10—15 minute la temperatura camerei. Se adaugă 0,6 *ml* acid sulfuric concentrat (4) şi după 20 minute se fotometrează la 560 *nm* faţă de o probă în alb care în loc de ser conţine 0,2 *ml* apă.

În proba standard se foloseşte 0,2 *ml* soluţie standard de colesterol (5) la care se adaugă 0,2 *ml* apă în loc de acid acetic şi apoi 5 *ml* reactiv de culoare, procedîndu-se în continuare ca şi la probă.

Calcul. Colesterol $mg\% = \frac{E \text{ probei}}{E \text{ standardului}} \times 200$

Se va folosi numai sticlărie perfect uscată.

Serurile icterice sau cu hemoliză dau rezultate eronate.

BIBLIOGRAFIE

Watson, D., Clin. Chim. Acta, 5, 1960, 637.

5.2.2. METODA FERRO ŞI HAM (DUPĂ CROCKET ŞI COLAB.)

Principiu. Se bazează tot pe reacţia Lieberman dar nu necesită acid dimetilbenzensulfonic.

Reactivi. 1) *Reactiv de culoare* alcătuit din 45 volume acid acetic glacial, 55 volume anhidridă acetică şi 20 volume acid sulfuric

Scanned with OKEN Scanner

concentrat. Amestecul se păstrează la +4°C, timp de 4 săptămîni. 2) *Standard de colesterol.* Acelaşi ca în metoda precedentă.

Tehnica. Se pipetează 4 *ml* reactiv de culoare; se adaugă apoi 0,2 *ml* ser în porţiunea superioară a eprubetei avînd grije să nu se amestece. Se agită apoi puternic timp de 10 secunde şi se citeşte extincţia după 10 minute la 615 *nm* faţă de o probă în alb alcătuită din 4 *ml* reactiv de culoare şi 0,2 *ml* ser fiziologic. Proba standard e alcătuită din 0,2 *ml* soluţie standard şi 4 *ml* reactiv.

Calculul se face ca în metoda precedentă.

BIBLIOGRAFIE

Crockett, R., Dallocchio, M., Broustet, J. P., Sagardiluz, I. et Bricaud, H., Arch. Mal. Coeur et Waisseaux, nr. 2 (Revue de l'Athérosclérose, 5, 1963, p. 55).

5.2.3. | METODA ZLATKIS—ZAK—BOYLE

Principiu. Colesterolul dă o coloraţie roşie cu clorura ferică în prezenţă de acid acetic glacial şi acid sulfuric concentrat.

Reactivi. 1) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,05% în acid acetic glacial. 2) Acid sulfuric concentrat p.a. 3) Standard colesterol 200 *mg%* în acid acetic glacial.

Tehnica. La 10 *ml* soluţie clorură ferică (reactiv 1) se adaugă 0,1 *ml* ser, se agită şi se lasă în repaus 15 minute. Se centrifughează la 3000 turaţii pe minut timp de 10 minute. La 5 *ml* supernatant clar se adaugă 3 *ml* acid sulfuric concentrat, se agită, se lasă în repaus 20 minute la întuneric. Paralel se efectuează o probă standard: 0,05 *ml* soluţie standard, + 5 *ml* reactiv 1, + 3 *ml* acid sulfuric. Se citesc extincţiile probei şi standardului la 570 *nm* faţă de proba în alb, alcătuită din 5 *ml* reactiv 1, + 3 *ml* acid sulfuric concentrat.

$$\text{Calcul. Colesterol } mg/100\ ml = \frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \times 200.$$

Observaţii. Se va avea grijă ca sticlăria să nu fie udă şi acidul acetic să nu conţină apă. În cazul cînd nu se formează opalescenţă la amestecarea serului cu reactivul (1) acidul acetic trebuie purificat în felul următor: 1000 *ml* acid acetic + 30 g trioxid de crom se fierbe 120 minute cu refrigerent cu reflux după care se distilează. Prima porţiune de 100 *ml* se aruncă. Reacţia de culoare este influenţată de prezenţa unei concentraţii ridicate de bilirubină în ser şi de o hemoliză accentuată.

BIBLIOGRAFIE

Zlatkis, A., Zak, B., Boyle, A. J., J. Lab. Clin. Med., 1953, *41*, 486.

Scanned with OKEN Scanner

5.2.4. DETERMINAREA COLESTEROLULUI ÎN PREZENȚA PIGMENȚILOR BILIARI (METODA PAREKH-JUNG)

Principiu. Se bazează pe precipitarea proteinelor serice și a bilirubinei oxidate spre biliverdină și eliberarea colesterolului din lipoproteine cu dezvoltarea unei colorații roșii-violete în prezența ionului feric în mediu de acid acetic și sulfuric.

Reactivi. 1) Acetat feric — Acetat de uranil; se prepară prin transformarea a 0,5 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ în $Fe(OH)_3$ în urma adăugării a 3 *ml* hidroxid de amoniu concentrat. Precipitatul obținut este separat prin centrifugare, spălat cu apă distilată, centrifugat și respălat. Precipitatul final se solvă în acid acetic glacial cu formare de acetat feric. Volumul se completează la 1 litru cu acid acetic glacial. Acestei soluții i se adaugă 0,1 g acetat de uranil sub formă de pulbere fină. Soluția se agită bine și se lasă să stea peste noapte. A doua zi se transvazează într-o sticlă brună, bine uscată putîndu-se conserva la temperatura camerei, dar la întuneric timp de 6 luni. 2) Acid sulfuric — sulfat feros: 0,1 g $FeSO_4$ anhidru se solvă parțial în 100 *ml* acid acetic glacial într-un balon cotat de 1 litru. Se adaugă imediat 100 *ml* acid sulfuric concentrat și se agită viguros amestecul. După răcire la temperatura camerei se completează cu acid sulfuric concentrat pînă la 1 litru. Se amestecă și se transvazează într-o sticlă brună perfect uscată. Se păstrează la temperatura camerei timp de 6 luni în absența aerului (sticla se parafinează). 3) Standard de colesterol 200 *mg*/100 *ml* cloroform.

Tehnica. Se pipetează 0,05 *ml* (50 *µl*) ser din probele de analizat în tuburi de centrifugă adăugîndu-se apoi 10 *ml* acetat feric — acetat de uranil (1). Se agită viguros, se lasă să stea 5 minute și se centrifughează 5 minute la 3.000 r.p.m. Se trec 3 *ml* din supernatant într-o altă eprubetă adăugîndu-se apoi 2 *ml* sulfat feros — acid sulfuric (2). Se agită puternic și după 20 minute se citesc la 560 *nm* în cuvă de 1 *cm* față de o probă în alb preparată din 3 *ml* acetat feric — acetat de uranil și 2 *ml* sulfat feros — acid sulfuric. Proba standard se prepară din 50 *µl* soluție standard de colesterol. Se evaporează solventul iar la rezidiul uscat se adaugă 10 *ml* acetat feric — acetat de uranil. Se procedează în continuare ca și în cazul probelor de analizat.

Calcul. $$\text{mg colesterol/100 ml ser} = \frac{E.\ \text{probei}}{E.\ \text{standard}} \times 200$$

Observații: Determinările de colesterol nu sînt influențate de prezența unei hemolize și de concentrații ale bilirubinei serice care pot

Scanned with OKEN Scanner

depăşi 15 *mg* bilirubină/100 *ml*. În cazul serurilor icterice se poate observa că proteinele precipitate în tubul de centrifugă au o coloraţie verzuie datorită oxidării bilirubinei spre biliverdină şi precipitării acesteia cu proteinele.

BIBLIOGRAFIE

Parekh A. C. — Yung D. H. — Anal. Chem. 1970, *42*, 1423.

5.3. | Dozarea colesterolului liber şi esterificat

Se bazează pe precipitarea selectivă şi cantitativă a colesterolului liber cu digitonină şi dozarea consecutivă a acesteia cu metoda descrisă pentru colesterolul total (Windaus 1901 citat de Kabara).

Reactivi. 1) Amestec de alcool etilic 96% şi acetonă în volume egale (amestecul este foarte inflamabil). 2) Digitonină 1% în alcool 50% (98,15 *ml* apă distilată + 100 *ml* alcool 96%). 3) Clorură ferică 0,05% în acid acetic glacial. 4) Acid sulfuric concentrat.

Tehnica. Într-un tub de centrifugă se măsoară 9 *ml* amestec alcool — acetonă (1) şi se adaugă 1 *ml* ser, agitîndu-se mereu. Se introduce apoi tubul în baie de apă, fierbînd timp de 2 minute. După răcire se centrifughează, iar din supernatantul clar se măsoară 1 *ml* (corespunzînd la 0,1 *ml* ser) şi se trece în altă eprubetă de centrifugă, adăugîndu-se apoi 1 *ml* reactiv (2). După o bună amestecare se lasă să stea 10 minute la temperatura camerei şi apoi se centrifughează 5 minute la 3000 turaţii pe minut. Supernatantul se îndepărtează, se suflă apoi 2 *ml* acetonă direct peste precipitat pentru a-l dispersa cît mai complet, se agită tubul pentru o cît mai bună spălare a precipitatului avîndu-se însă grijă să nu se piardă din precipitat. Se centrifughează 10 minute la 3000 turaţii/minut, se îndepărtează supernatantul. Se usucă pereţii tubului cu hîrtie de filtru. Se suflă apoi din pipetă 10 *ml* reactiv (3), peste precipitat obţinîndu-se o dizolvare instantanee. Din această soluţie se iau 5 *ml* la care se adaugă 3 *ml* reactiv (4) fotometrîndu-se apoi după răcire la 570 *nm*. Din comparaţia cu extincţia dată de standard se obţine valoarea colesterolului liber (precipitabil cu digitonină). Diferenţa dintre colesterolul total şi colesterolul liber reprezintă colesterolul esterificat. Separarea colesterolului liber de colesterolul esterificat mai poate fi obţinută şi prin cromatografia în strat subţire (pag. 204).

Scanned with OKEN Scanner

Kabara, I. I., *Determination and Microscopic Localization of Cholesterol* în Glick, D. (Editor), *Methods of Biochemical Analysis*, vol. X, Interscience, New York—London, 1962, p. 263.

5.4. Dozarea trigliceridelor

Determinarea trigliceridelor poate fi efectuată prin metode colorimetrice, fluorimetrice sau enzimatice. În cele ce urmează vom descrie o metodă colorimetrică și o metodă enzimatică.

5.4.1. METODA COLORIMETRICĂ (Reacția cu acid cromotropic)

Principiu. Metoda se bazează pe reacția de culoare roșie vișinie dată de acidul cromotropic cu aldehida formică produsă prin oxidarea glicerolului din compoziția trigliceridelor. Procedeul inițial descris de van Handel și Zilversmit a suferit diverse modificări în special în ceea ce privește extracția trigliceridelor. Prezentăm mai jos varianta propusă de Carlson cu unele simplificări așa cum se practică în laboratorul Clinicii I Medicale.

Reactivi: 1) Cloroform, 2) alcool metilic, 3) acid silicic activat. Granulele de acid silicic (silicagel sau florizil) se spală cu HCl concentrat mojarîndu-se. Se lasă peste noapte și apoi se spală cu apă de robinet și în continuare cu apă distilată pînă devine lipsit de cloruri. Se spală cu eter etilic și se usucă la 100°C peste noapte. Activarea la 100°C se repetă înaintea fiecărei determinări (peste noapte); 4) Hidroxid de potasiu alcoolic 0,4%. Se dizolvă 2 g KOH în 100 *ml* alcool etilic 95%. Înainte de utilizare se diluează o parte din soluția de mai sus cu 4 părți alcool etilic 95%; 5) Acid sulfuric 0,2 *N*; 6) Metaperiodat de sodiu 0,05 *M*. Se dizolvă 1,069 g $NaIO_4$ în 100 *ml* apă distilată. Se poate prepara pornindu-se de la acid periodic (HIO_4). Se dizolvă 2,875 g acid periodic în 225 *ml* apă distilată și se neutralizează ca NaOH 0,5 *N* utilizînd roșu de metil ca indicator; 7) Arsenit de sodiu 0,5 *M*. Se dizolvă 6,5 g arsenit de sodiu în 100 *ml* apă. Se poate obține și prin dizolvarea a 2,25 g NaOH și 5 g trioxid de arsen (As_2O_3) în 100 *ml* apă distilată; 8) Reactiv acid cromotropic. Se dizolvă 0,5 g acid cromotropic în 50 *ml* apă distilată. Separat se amestecă 150 *ml* H_2SO_4 concentrat cu 75 *ml* apă distilată răcită la gheață. După răcire se amestecă soluțiile de acid cromotropic și acid sulfuric. Reactivul se păstrează la gheață în sticlă brună și trebuie înlocuit la

Scanned with OKEN Scanner

2—3 săptămîni; 9) Soluţie standard trigliceride. Se dizolvă 100 *mg* tripalmitină în 100 *ml* cloroform. Se iau 10 *ml* din soluţia de mai sus şi se completează la 100 *ml* cu cloroform. Standardul va conţine 0,1 *mg* tripalmitină/*ml*. Este necesar ca tripalmitina să fie cît mai pură iar în lipsa tripalmitinei se poate folosi trioleina sau tristearina.

Tehnica constă în extracţia trigliceridelor şi îndepărtarea fosfolipidelor contaminante urmată apoi de hidroliză şi dozarea glicerolului eliberat.

Extracţia. Se adaugă picătură cu picătură 1 *ml* ser la 5 *ml* metanol, în timp ce se agită eprubeta. Se produce un precipitat fin. Se adaugă apoi exact 10 *ml* cloroform urmaţi imediat de 15 *ml* ser fiziologic. Se lasă peste noapte pentru a obţine o bună separare a celor două faze. În dimineaţa următoare se îndepărtează parţial faza apoasă prin aspirare la trompa de apă iar faza cloroformică se aspiră cu grijă cu o seringă cu piston de sticlă sau cu o pipetă Pasteur avînd grijă să nu se aspire din faza apoasă. De regulă se pot obţine cu uşurinţă 6—8 *ml* fază cloroformică care se trec într-o altă eprubetă cu dop rodat, adăugîndu-se în continuare aproximativ 500 *mg* pulbere de acid silicic activat. Se astupă imediat eprubetele şi se agită cîteva secunde. Se lasă eprubetele în repaus pentru sedimentarea acidului silicic şi se agită uşor eprubetele pentru a se spăla pereţii eprubetei fără a se trece în suspensie acidul silicic sedimentat. Eventual se poate centrifuga timp de cîteva minute faza cloroformică conţinînd trigliceride şi avînd restul de fosfolipide adsorbit pe acidul silicic.

Hidroliza trigliceridelor şi dozarea glicerolului rezultat. Se iau 0,5 *ml* din extractul cloroformic şi se trec în eprubete cu dop rodat. În această etapă se pregăteşte o probă în alb conţinînd 0,5 *ml* cloroform (sau un „extract în alb" efectuat în paralel cu probele dat conţinînd 1 *ml* apă în loc de ser), şi două probe standard din 0,5 *ml* şi 1 *ml* soluţie standard. Se evaporează apoi cloroformul din probele de analizat, proba în alb şi standard prin încălzire pe o baie de apă la 60—80°C, avînd grijă ca eprubetele să nu rămînă în baie mai mult decît este necesar pentru evaporarea cloroformului. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă 0,5 *ml* hidroxid de potasiu alcoolic şi se astupă eprubetele; se lasă să hidrolizeze trigliceridele prin încălzire timp de 30 *min* la 60°C. Se lasă să se răcească puţin şi se adaugă 0,5 *ml* H_2SO_4 0,2 *M*. Se încălzesc apoi eprubetele deschise pe baie de apă la fierbere aproximativ 15 min pentru îndepărtarea alcoolului. După răcire se adaugă 0,1 *ml* metaperiodat de sodiu (reactiv 6) pentru oxidarea glicerolului şi se agită timp de 10 minute. Se opreşte apoi oxidarea adăugîndu-se 0,1 *ml* arsenit de sodiu (reactiv 7) şi agitîndu-se pentru eliminarea iodului degajat (În această etapă se poate observa apariţia unei culori gălbui date de iod care trebuie să dispară în decurs de cîteva minute).

Scanned with OKEN Scanner

Se adaugă apoi 5 *ml* reactiv acid cromotropic, se agită şi se încălzesc apoi eprubetele închise cu dop rodat timp de 30 *min*, pe baie de apă la fierbere. Este recomandabil ca acidul cromotropic să fie ferit de lumina zilei.

După răcire se citesc extincţiile la 570 *nm* faţă de proba în alb.

Calcul. În cazul folosirii unui singur standard de 0,5 *ml* tripalmitină 0,1 *mg/ml* şi ţinîndu-se cont de diluţia serului în faza cloroformică:

$$\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 100 = mg \text{ trigliceride/100 } ml \text{ ser}$$

În cazul folosirii a două standarduri se interpolează extincţia obţinută pentru probele de analizat la o curbă ţinînd cont că 0,5 *ml* standard tripalmitină corespunde la 100 *mg* trigliceride la 100 *ml* ser iar 1 *ml* standard dă o extincţie corespunzătoare la 200 *mg* trigliceride la 100 *ml* ser. Evident curba poate fi construită pe baza mai multor puncte. Este însă necesar ca determinările de probe standard să se efectueze întotdeauna în paralel cu probele de analizat.

Observaţii

Metoda permite reducerea la jumătate a serului, respectiv a reactivilor utilizaţi, fără a pierde din precizie.

Atunci cînd se bănuieşte o concentraţie ridicată a trigliceridelor serice (ser lactescent) se recomandă diluarea serului de 2 pînă la de 10 ori cu ser fiziologic înainte de extracţie.

În unele articole trigliceridele se exprimă în milimoli la litru. Transformarea valorilor din *mg*/100 *ml* în milimoli la litru se face înmulţindu-se cu factorul 0,0114. De exemplu 100 *mg*/100 *ml* $\times 0{,}0114 =$ 1,14 milimoli la litru. Pentru valori normale vezi interpretarea modificărilor lipidelor serice (pag. 198).

O bună extracţie a trigliceridelor şi o îndepărtare a fosfolipidelor se poate obţine prin următorul procedeu: 0,5 *ml* ser se adaugă picătură cu picătură la 10 *ml* amestec hexan-alcool propilic (în volume egale). Se adaugă 2 perle de sticlă la balonul cotat de 100 *ml* în care se face extracţia şi se agită bine timp de 30 minute. Se adaugă 50 *ml* soluţie ClNa 0,9% şi se agită 2—3 minute. Se completează la 100 *ml* cu soluţie ClNa 0,9%. Se separă cele două faze fie prin centrifugare în cupe de centrifugă astupate cu dop de cauciuc învelit în celofan, fie aşteptîndu-se ca separarea celor două faze să aibe loc în balonul cotat de 100 *ml*. Din supernatant, partea organică, se iau 3 *ml* care se trec într-un flacon Erlenmeyer conţinînd 9 *ml* amestec hexan-eter (hexan 65 volume, eter 10 volume) şi 0,5 g silicagel activat. Se astupă

și se agită 30 minute, lăsîndu-se apoi ca silicagelul să sedimenteze. Din extractul hexan eter se ia 1 *ml* care se trece într-o eprubetă cu dop rodat și se evaporează solventul (eprubeta deschisă). În continuare se procedează la saponificarea trigliceridelor, oxidarea glicerolului și reacția de culoare a aldehidei formice cu acidul cromotropic așa cum s-a arătat mai sus. În cazul acestui procedeu de extracție se va ține cont că diluarea trigliceridelor din 1 *ml* ser (în faza organică) s-a efectuat de 80 de ori.

BIBLIOGRAFIE

Van Handel, E., Zilversmit, D. B.: J. Lab. Clin. Med., 1957, 50, 152. Carlson, L. A.: J. Atheroscl. Res., 1963, 3, 334.

5.4.2. | METODA ENZIMATICĂ (METODA EGGSTEIN MODIFICATĂ)

Principiu. Prin încălzire cu hidroxid de potasiu în soluție alcoolică trigliceridele serice sînt scindate în glicerol și acizi grași. Glicerolul eliberat este determinat pe baza următoarelor reacții enzimatice catalizate de glicerokinază (GK), piruvatkinază (PK) și lacticodehidrogenază (LDH):

$$\text{Glicerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{glicero} - 1 - \text{fosfat} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{fosfoenolpiruvat} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{piruvat}$$

$$\text{Piruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}$$

În aceste condiții cantitatea de glicerol, respectiv de trigliceride va fi proporțională cu scăderea extincției la 366 *nm*.

Reactivi. 1) Hidroxid de potasiu 0,5 *N* în alcool 90%. *2*) Sulfat de magneziu 150 *mMol*/litru. *3*) Amestec de reacție conținînd tampon trietanolamină (*pH 7*) *27 mMol*/litru, sulfat de magneziu 4 *nmol*/litru, clorură de potasiu 120 *mmol*/litru, ATP 1,3 *mmol*/litru, fosfoenolpiruvat 0,36 *mmol*/litru, NADH + H^+ 0,29 *mmol*/litru, LDH 3 µg/*ml*, PK 5 µg/*ml*. *4*) Suspensie glicerokinază (GK) 12 µg/*ml*. Ultimii doi reactivi sînt furnizați sub formă deshidratată (Test Kombination Triglyceride-Behringwerke A.G.) dizolvîndu-se în apă distilată înainte de utilizare. Sub formă dizolvată se păstrează 72 ore la +4°C și cel mult 8 ore la temperatura camerei.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se amestecă 0,2 *ml* ser cu 0,5 *ml* hidroxid de potasiu în soluție alcoolică (reactiv 1). Se astupă eprubetele și se încălzesc pe baia de apă la 65—70°C, timp de 30 mi-

Scanned with OKEN Scanner

nute. După răcire se adaugă 1 *ml* sulfat de magneziu se amestecă și se centrifughează. Se iau apoi 0,5 *ml* de supernatant și se trec în cuva spectrofotometrului în care s-au pipetat în prealabil 2,5 *ml* din amestecul de reacție (reactiv 3). Se lasă să stea la temperatura camerei timp de 5 minute și se citește extincția E_1 la 366 *nm* în cuve de 1 *cm*. Se adaugă apoi 0,02 *ml* suspensie glicerokinază (reactiv 4) și după 5 minute se citește extincția E_2.

Se recomandă pentru corecția rezultatelor ca după încă alte 5 minute să se citească din nou extincția E_3. O eventuală scădere a extincției E_3 față de valorile E_2 nu e datorită glicerolului ci unor reacții secundare.

Calcul. Se obține scăderea extincției la 366 *nm* cauzată de glicerol.

$\Delta E = (E_1 - E_2) - (E_2 - E_3)$. Se calculează apoi concentrația de trigliceride pe baza formulei:

$\Delta E \times 1377 = mg$ trigliceride/100 *ml*

Dacă determinările s-au efectuat la 340 *nm* formula devine:

$\Delta E \times 730 = mg$ trigliceride/100 *ml*.

BIBLIOGRAFIE

Eggstein, M., Klin. Wschr., 44, 1966, 267.

Observații. În cazul utilizării spectrofotometrului Zeiss VSU II punctul de zero se stabilește față de aer, lucrînd cu o fantă de deschidere de 0,34, iar extincția de la care se pornește (înainte de adăugarea glicerokinazei) va fi stabilită în jur de 0,5. Dacă scăderea extincției este mai mare de 0,4 se va dilua supernatantul în proporție de 1:5, folosindu-se ca diluant NaCl 0,9%. Și mai bine este ca serurile lipemice să fie diluate de la bun început (înainte de saponificare) cu ser fiziologic. La calcul se va ține bineînțeles cont de gradul diluției.

Trebuie precizat că prin metoda descrisă se dozează atît glicerolul din trigliceride cît și micile cantități de glicerol liber. Pentru dozarea glicerolului liber (calculat ca trigliceride) se pipetează în cuva spectrofotometrului 0,5 *ml* ser de analizat (netratat cu hidroxid de potasiu alcoolic) și 2,5 *ml* amestec de reacție (reactiv 3), se notează extincția E_1, se adaugă 0,02 *ml* glicerokinază și se procedează în continuare ca și pentru determinarea glicerolului total (gliceride totale). În acest caz se utilizează însă un alt factor la calcul. Astfel la 366 nm: $\Delta E \times 162 = mg$ glicerol liber/100 *ml*.

Această valoare a glicerolului liber (calculat ca trigliceride) va fi scăzută din gliceridele totale obținîndu-se concentrația trigliceridelor adevărate. Întrucît concentrația glicerolului liber (exprimat ca trigliceride) este de abia 4—16 *mg*/100 *ml* iar trigliceridele totale oscilează la nor-

Scanned with OKEN Scanner

mali între 50—150 *mg*/100 *ml* eroarea dată de glicerolul liber este mică.

O evaluare indirectă și aproximativă a trigliceridelor poate fi obținută după formula: Trigliceride = Lipide totale — (2,25 × colesterolul seric + 90).

5.5. | Dozarea fosfolipidelor totale

Principiu. Dozările de fosfolipide constau dintr-o determinare de fosfor din lipidele serice în prealabil izolate și mineralizate. Metodele bazate pe extracția lipidelor cu solvenți organici (Bartlet) sînt foarte precise, dar laborioase fiind recomandate mai ales atunci cînd se urmărește și o separare cromatografică a fracțiunilor fosfolipidice. Descriem mai jos o metodă mai simplă bazată pe precipitarea cu acid tricloracetic a fosfolipidelor împreună cu proteinele serice. Întrucît proteinele serice sînt lipsite de fosfoproteine, fosforul din precipitat va proveni doar din fosfolipidele lipoproteinelor.

Reactivi: 1) Acid tricloracetic 5 și 10%; 2) Amestec nitropercloric (HNO_3 conc. 1 volum, $HClO_4$ conc. 2 volume); 3) Soluție standard de fosfor: a) soluție stoc de 1 mg/ml: 11,550 g $Na_2PO_4 \cdot 12H_2O$ în 1000 ml apă; b) soluție de lucru (10 µg/ml) se prepară diluînd un ml. din soluția stoc la 100 ml cu acid tricloracetic 10%; 4) Soluție molibdat de amoniu. Se dizolvă 50 g molibdat de amoniu. $7H_2O$ în 500 ml H_2SO_4 10 N. 5) Reactiv molibdenic (proaspăt preparat): se amestecă 5 ml reactiv 4 cu 35 ml apă distilată și se dizolvă în amestec 2,5 g sulfat feros ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) aducîndu-se apoi volumul la 50 ml cu apă distilată.

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă conică din pyrex se pipetează 0,2 ml ser și 1 ml apă distilată. Se adaugă apoi picătură cu picătură, agitînd 7 ml acid tricloracetic 5%. Se centrifughează 10 minute la 3500 r.p.m. și se îndepărtează cît mai complet supernatantul, lăsînd să se scurgă excesul de lichid pe o hîrtie de filtru. Peste precipitat se toarnă 0,7 ml amestec nitropercloric și se efectuează mineralizarea încălzind 15—20 min, pe flacără mică la un bec Bunsen. Precipitatul se dizolvă, degajîndu-se vapori nitroși. Lichidul la început galben-brun se decolorează și devine limpede concentrîndu-se la un volum de aproximativ 0,2 ml. După răcire se adaugă 4 ml acid tricloracetic 10% și 2,8 ml reactiv molibdenic (reactiv 5). În paralel se pregătește o probă în alb conținînd 4,2 ml acid tricloracetic 10% și 2,8 reactiv molibdenic și un standard alcătuit din 2 ml soluție standard de lucru (10 µg P/ml), 2,2 ml acid tricloracetic 10% și 2,8 ml reactiv molibdenic. După

Scanned with OKEN Scanner

20 minute se citeşte extincţia probei şi standardului faţă de proba în alb la 750 nm.

Calcul

$$\text{mg fosfor lipidic/100 ml} = \frac{Ep \times 20 \times 500}{Est \times 1\,000} = \frac{Ep}{Est} \times 10$$

Înmulţindu-se valorile fosforului lipidic cu factorul 25 se obţin mg fosfolipide/100 ml care la normali oscilează între 180 şi 260 mg/100 ml.

BIBLIOGRAFIE

Bartlet G. R., J. Biol. Chem. 1959, 234, 466. Zilversmit D. B., Davis A. L., J. Lab. Clin. Med. 1950, 35, 155.

5.6. Dozarea acizilor graşi liberi

5.6.1. METODA TITRIMETRICĂ DOLE

Se bazează pe titrarea cu hidroxid de sodiu a acizilor graşi liberi extraşi din produsul biologic.

Reactivi: 1) Amestec Dole: 40 *ml* alcool izopropilic + 10 *ml* n-heptan + 1 *ml* H_2SO_4 1 N. *2*) n-heptan. *3*) NaOH 0,1 *N*. *4*) Albastru de Nil soluţie apoasă 0,1%. *5*) Alcool 99%. *6*) Standard de acid palmitic. *7*) Amestec indicator (10 *ml* albastru de Nil 0,1% + 90 *ml* alcool 99%).

Tehnica. Un *ml* ser sau plasmă se amestecă cu 5 *ml* amestec de extracţie (1), într-un tub de centrifugă de 15—20 *ml* avînd dop rodat, agitîndu-se bine timp de 10 secunde. Se adaugă apoi 3 *ml* n-heptan (2) şi 2 *ml* apă distilată agitîndu-se din nou timp de 3 minute. După separarea spontană a celor două faze se iau 3 *ml* din faza superioară (organică) perfect clară şi se trec în vasul de titrare care conţine 1 *ml* amestec indicator (7). Se titrează cu NaOH 0,1 *n* (3) dintr-o microbiuretă, barbotînd azot în amestec cu ajutorul unui tub capilar. La apariţia unei coloraţii roze denotînd virarea indicatorului se opreşte titrarea. Eventual în cursul titrării se compară cu culoarea unui standard preparat prin titrarea unei soluţii conţinînd o cantitate cunoscută de acid palmitic dizolvat în heptan.

Calcul

$$\mu Eq \text{ AGL/l plasmă} = \frac{4{,}5}{3} \times (a - b) \times 1000 \times 0{,}1 \times \frac{100}{95}$$

în care $\frac{4{,}5}{3}$ este un factor empiric de recuperare (se titrează o mostră de 3 *ml* soluţie heptanică, iar la sistemul de extracţie s-au adăugat 3,98 *ml* heptan. Măsurîndu-se exact „faza heptanică" s-a găsit a fi 4,5 ml

întrucît s-a produs un oarecare grad de amestecare cu alcoolul izopropilic).

a = microlitri NaOH 0,1 n, utilizaţi pentru titrarea probei.

b = microlitri NaOH 0,1 n, utilizaţi pentru titrarea unui blanc în care se utilizează apă distilată în loc de plasmă.

$\frac{100}{95}$ = gradul de recuperare a acidului palmitic pur adăugat la plasmă. Acest factor se poate obţine prin încercări preliminare în laborator.

BIBLIOGRAFIE

Dole, V. P., Meinertz, H., J. Biol. Chem., 1960, *235*, 2595.

5.6.2. | METODA COLORIMETRICĂ NOVÁK

Se bazează pe reacţia de culoare a complecşilor de cobalt ai acizilor graşi liberi cu α-nitroso-β-naftolul.

Reactivi. *1*) Amestec de extracţie Dole (vezi pag. 186). *2*) N-heptan. *3*) Amestec cloroform (5 volume) — heptan (1 volum). *4*) Reactiv cobaltic. *Soluţia A:* 6 g azotat de cobalt ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ + 0,8 *ml* acid acetic glacial, se aduc la un volum de 100 *ml* cu o soluţie saturată de sulfat de potasiu (K_2SO_4). (Soluţia saturată de K_2SO_4 se obţine la fierbere şi apoi se păstrează la 37°C în prezenţa unor cristale în exces). Se filtrează înainte de utilizare. *Soluţia B* este o soluţie saturată de Na_2SO_4 obţinută la fierbere şi păstrată în prezenţă de exces de cristale la 37°C.

Prepararea reactivului cobaltic: 1,35 *ml* trietanol amină se aduce la 10 *ml* cu soluţie A. Se adaugă apoi 7 *ml* reactiv B şi se agită. Reactivul astfel preparat nu este stabil şi trebuie preparat proaspăt la fiecare serie de determinări. *5*) Reactiv pentru cobalt: soluţie de α-nitroso-β-naftol 0,4% în alcool 96%. Înainte de utilizare se diluează 1 parte soluţie 0,4% cu 11,5 părţi alcool 96%. *6*) Acid palmitic p.a.

Tehnica. 0,2 *ml* ser se agită 10 secunde cu 1 *ml* amestec Dole (1) în tubul de 10 *ml* cu dop rodat. Se adaugă 1,2 *ml* heptan (2) şi 2 *ml* apă distilată, agitîndu-se din nou timp de 3 minute. După separarea spontană a celor două faze se iau 1,2 *ml* din faza superioară heptanică şi se trec în altă eprubetă de 10 *ml* cu dop rodat. Se adaugă 1,8 *ml* cloroform-heptan (3) şi 2 *ml* reactiv cobaltic (4) proaspăt preparat. Se agită bine timp de 5 minute şi apoi amestecul se centrifughează timp de 15 minute la 2500 turaţii pentru o cît mai bună separare a celor două faze. Se ia apoi 1 *ml* din stratul superior şi se amestecă cu 1,5 *ml*

Scanned with OKEN Scanner

soluţie de α-nitroso-β-naftol (5). Culoarea portocalie care se dezvoltă este stabilă pe timp de cîteva ore. Citirea se face la 500 *nm* faţă de o probă în alb în care 0,2 *ml* apă distilată în loc de ser de analizat au fost trataţi în mod similar cu probele de analizat.

Prepararea standardului. Dizolvîndu-se 12,8 *mg* acid palmitic p.a. (GM 256) la 25 *ml* hexan se obţine o soluţie conţinînd 2 *µEq/ml.* Amestecîndu-se un volum din această soluţie cu 3 volume hexan se ajunge la o concentraţie de 0,5 *µEq/ml.* Se iau în 3 eprubete cîte 0,1, 0,2 şi 0,4 *ml* din această soluţie şi se evaporă la sec. Se adaugă cîte 0,2 *ml* ser fiziologic în fiecare eprubetă astfel încît concentraţia de acizi graşi liberi în cele trei probe standard ajunge la 0,25 *µEq/ml,* 0,5 *µEq/ml* respectiv 1 *µEq/ml.* Se procedază apoi ca şi în cazul probelor de ser de analizat. Pentru precizie este recomandabil ca în fiecare serie de analizat să se facă determinări şi cu cel puţin 2 diluţii din standardul de acid palmitic. Valorile AGL se citesc din curba obţinută cu ajutorul diluţiilor din soluţia standard şi se exprimă în *µEq/ml* sau *mEq/l.* Pentru valori normale vezi tabelul 11, pag. 199.

BIBLIOGRAFIE

Novák, M., J. Lipid. Res., 6, 1965, p. 431.

5.7. Dozarea glicerolului seric (Metoda Lambert şi Neish modificată de Korn).

Se bazează pe reacţia de culoare (roşie-violetă) între acidul cromotropic şi aldehida formică produsă prin oxidarea glicerolului liber din ser.

Reactivi. 1) Acid sulfuric 0,1 normal. *1 a*) Acid sulfuric normal. *2*) Wolframat de sodiu 25%. *3*) Periodat de sodiu ($NaIO_4$) 0,05 molar. *4*) Arsenit de sodiu ($Na_2H\ AsO_3$) 0,5 molar. *5*) Acid cromotropic. Reactivii 3, 4 şi 5 sînt descrişi la tehnica de dozare a trigliceridelor. *6*) Soluţie standard de glicerol 1,6 *mg%* (16 *µg/ml*).

Tehnica. 0,25 *ml* ser se deproteinizează cu 2 *ml* SO_4H_2 0,1 *n* (1) şi 0,25 *ml* wolframat de sodiu 25%. (După experienţa noastră se poate folosi şi deproteinizarea cu acid tricloracetic 20% folosindu-se volume egale de ser şi acid tricloracetic). Se centrifughează la 3000 turaţii timp de 10 minute. Se iau 0,5 *ml* din supernatantul clar şi se trec într-o eprubetă care conţine 0,5 *ml* acid sulfuric normal (1 a).

Ca probă în alb se foloseşte 0,5 *ml* apă, iar ca standard 0,5 *ml* de soluţie de glicerol standard (6), conţinînd 8 *µg* glicerol pe 0,5 *ml*).

Scanned with OKEN Scanner

Se adaugă 0,5 *ml* acid sulfuric normal (1 a) la eprubetele conţinînd blancul şi standardul.

În continuare se adaugă în toate eprubetele 0,1 *ml* periodat de sodiu 0,05 molar (3). După 5 minute la temperatura camerei se adaugă 0,1 *ml* arsenit de sodiu 0,5 molar. (4). Se agită apoi eprubetele aproximativ 10 minute pînă la dispariţia culorii galbene produsă prin degajarea iodului şi se adaugă 9 *ml* acid cromotropic (5). Se astupă eprubetele cu dop rodat şi se ţin 30 minute la termostat (100°C). După răcire se fotometrează la 570 *nm* faţă de proba în alb.

$$\textit{Calcul. mg} \text{ glicerol } \% = \frac{E \text{ probei} \times 16}{E \text{ standardului}}$$

Cînd deproteinizarea s-a efectuat cu acid tricloracetic în volum egal cu serul, calculul se face după formula:

$$mg \text{ glicerol } \% = \frac{E \text{ probei} \times 3{,}2}{E \text{ standardului}}$$

BIBLIOGRAFIE

Lambert, M., Neish, A. C., Canad. J. Rev. 28, 1950, 83; Korn, E. D., J. Biol. Chem., 215, 1955, 1.

Observaţii. Metoda Korn nu este întru totul specifică pentru glicerol. Ea este însă destul de rapidă şi cu ajutorul ei se pot urmări modificările survenite în concentraţia glicerolului în urmă lipolizei in vitro şi într-o oarecare măsură a intensităţii procesului de scindare a trigliceridelor din ţesutul adipos. Metode mai precise sînt cele enzimatice care folosesc glicerokinaza şi glicerofosfatdehidrogenaza. Aprecierea enzimatică a glicerolului liber (exprimat ca trigliceride) este redată la pagina 183. Pentru documentare recomandăm articolul:

Bergmeyer, H. U., Holz, G., Kaunder, E. M., Moellering, H. and Wieland, O., Biochem Z., 1961, *333*, p. 471.

5.8. | Dozarea corpilor cetonici (Metoda Neuweiler)

Principiu. Acetona existentă şi cea formată din acid acetil — acetic şi din acid β-oxibutiric — prin oxidarea acestora cu bicromat de potasiu dă o reacţie de culoare cu aldehida salicilică în mediul alcalin.

Reactivi. 1) Wolframat de sodiu 10%. *2*) H_2SO_4 2/3 *n*. *3*) Acid sulfocromic: 2 *g* $K_2Cr_2O_7$ se dizolvă în puţină apă + 20 *ml* H_2SO_4

Scanned with OKEN Scanner

concentrat ad 100 *ml*, cu apă. *4*) KOH 11,33 *n* (63,6 *g* KOH ad 100 *ml* cu H_2O). *5*) Aldehidă salicilică: 10 *g* + 90 *ml* alcool etilic 95%.

Tehnica. 5 *ml* sînge recoltat pe anticoagulant (pulbere de oxalat de sodiu) se pun într-un balon Erlenmeyer împreună cu 35 *ml* apă distilată şi 5 *ml* wolframat de sodiu (1) iar apoi prin agitare continuă se adaugă 5 *ml* acid sulfuric 2/3 *n* (se adaugă încet, picătură cu picătură). Conţinutul balonului se agită de 6—8 ori şi după 15—20 minute se filtrează. 30 *ml* filtrat se trec într-un balon şi se adaugă 1,5 *ml* H_2SO_4 concentrat şi 15 *ml* acid sulfocromic. Se distilează 25 minute (a se evita folosirea dopurilor de cauciuc). În cilindrul gradat de colectare se pune în prealabil 25 *ml* apă şi după distilare se completează la 60 *ml*. Din acest lichid se scot 20 *ml* (care corespund la 1 *ml* sînge), se pun într-un balon Erlenmeyer şi se adaugă 20 *ml* KOH 11,33 *n* + 10 *ml* aldehidă salicilică. Se agită şi se pune pentru exact 20 minute într-o baie de apă la 50°C. Se răceşte şi se fotometrează la 530 *nm* faţă de o probă în alb conţinînd 20 *ml* apă + 20 *ml* KOH + 10 *ml* aldehidă salicilică.

Curba de calibrare. 1 *g* acetonă se dizolvă în 1000 *ml* H_2O. Din această soluţie se scot 2, 5, 10, 20 *ml* şi se completează fiecare la 20 *ml* cu apă. Diluţiile corespund la 2, 5, 10 şi 20 *mg* acetonă, la 100 *ml* sînge. În continuare se procedează ca şi în cazul probelor din sînge.

Dacă concentraţia corpilor cetonici depăşeşte 20 *mg*%, lichidul obţinut după distilare se diluează ţinîndu-se cont de diluţie la calcularea rezultatului.

Valori normale: 1,5—3,5 *mg*% (exprimate în acetonă).

BIBLIOGRAFIE

Neuweiler, W., Klin. Woch., 1933, 869.

5.9. Determinarea lipoproteinelor

S-au încercat diferite metode pentru separarea, identificarea şi dozarea lipoproteinelor. Unele metode ca de exemplu ultracentrifugarea sînt precise dar necesită aparatură complexă fiind inaccesibile laboratorului clinic. Cu titlu informativ recomandăm lucrăile lui De Lalla şi Gofman (1954) şi cele ale lui Pezold (1961).

Alte metode se bazează pe flocularea lipoproteinelor cu diverse polizaharide sulfatate (Burstein, 1961). Acestea sînt în general simple, dar insuficient standardizate cantitativ.

Scanned with OKEN Scanner

După experienţa noastră şi după datele din literatură, metodele de separare electroforetică sînt cele mai adecvate, fiind suficient de precise, uşor de efectuat şi putînd furniza date diferenţiate, asupra diverselor clase de lipoproteine. Introducerea pe scară tot mai largă a electroforezei a diminuat importanţa diverselor teste de floculare. Redăm mai jos pe scurt cîteva din aceste teste.

BIBLIOGRAFIE

De Lalla, O. F., Gofman, I. W., *Ultracentrifugal Analysis of Serum Lipoproteins* in *Methods of Biochemical Analysis*, vol. I, Ed. D. Glick, Interscience Publishers, New-York, 1954, p. 459. Pezold, F. A., *Lipide und Lipoproteine in Blutplasma*, Berlin—Göttingen—Heidelberg, Ed. Springer, 1961.

5.9.1. | PRECIPITAREA BETA-LIPOPROTEINELOR (DUPĂ BURSTEIN)

Burstein a obţinut o precipitare rapidă, selectivă şi cantitativă a beta-lipoproteinelor prin diverse procedee dintre care amintim:

a) Amestecarea a 2 *ml* soluţie $CaCl_2$ 0,025 *M* (0,27 *g* $CaCl_2$ siccum la 100 *ml* apă distilată) cu 0,2 *ml* ser diluat 1/5 şi cu 0,04 *ml* soluţie heparină 1%.

b) Amestecarea a 1 *ml* ser nediluat cu 0,02 *ml* dintr-o soluţie sulfat de dextran 10% şi 0,1 *ml* clorură de calciu 1 *M* (11 *g* $CaCl_2$ siccum la 100 *ml* H_2O).

c) 2 *ml* ser diluat 1/5 cu soluţie NaCl 10% + 2 *ml* polivinil-pirolidonă 26%.

d) Se amestecă 2 *ml* ser nediluat cu 0,1 *ml* $MgCl_2$ 2 *M* (40,6 *g* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ se dizolvă în 100 *ml* apă distilată) şi se adaugă 0,1 *ml* fosfowolframat de sodiu 4% cu *pH* 7,5—7,6 (4 *g* acid fosfowolframic se amestecă cu 15 *ml* soluţie NaOH *n* şi se completează la 100 *ml* cu apă distilată. Se ajustează apoi *pH*-ul).

Prin centrifugare timp de 10—15 minute la 6000 r.p.m. beta-lipoproteinele precipitate sedimentează astfel încît supernatantul este lipsit de beta-lipoproteine. Beta-lipoproteinele precipitate se redizolvă cu uşurinţă în tampon barbituric la *pH* 7,6 după îndepărtarea agenţilor precipitanţi, iar la analiza electroforetică beta-lipoproteinele redizolvate îşi păstrează viteza de migrare. Date recente arată că prin aceste procedee se precipită atît beta cît şi prebetalipoproteinele.

Aprecierea cantitativă a lipoproteinelor precipitate cu unul din procedeele amintite mai sus poate fi efectuată: prin dozări de lipide sau nefolometric.

Scanned with OKEN Scanner

5.9.2. DOZAREA COLESTEROLULUI LEGAT DE BETA-LIPOPROTEINE

Se precipită beta-lipoproteinele cu unul din procedeele de mai sus (de preferință pe serul nediluat) și se dozează colesterolul în serul integral și în supernatant.

Diferența între cele două valori indică colesterolul din fracțiunea beta și prebeta. Ținînd cont și de conținutul în trigliceride se poate calcula colesterolul din beta-lipoproteine după formula de mai jos.

Procedeu. La 2 *ml* ser se adaugă 0,1 *ml* $MgCl_2$ 2 *M* și 0,1 *ml* fosfowolframat de sodiu 4% cu *pH*-ul 7,5 (procedeul de la pag. 191). Se centrifughează 10 minute la 6000 ture.

Se determină colesterolul în serul integral și în supernatant cu metoda Zlatkis, Zak și Boyle (vezi pag. 177). Valorile obținute pentru colesterolul din supernatant (colesterolul α) se înmulțesc cu 1,1 pentru a se ține cont de diluție.

Colesterolul legat de beta-lipoproteine = colesterolul total — $-\left(\text{colesterolul din supernatant} + \frac{\text{Trigliceride}}{5}\right)$.

BIBLIOGRAFIE

Burstein, M., *Les lipoproteines du plasma humain.* Bull. Schweiz Acad. Med. Wiss, 1961; Burstein, M., N. Rev. Franc-d'Hemat., 3, 1963, 139; Beaumont, J. L., Carlson, L. A., Cooper, G. R., Fejfar, Z., Fredrickson, D. S., Strasser, T., Bull. Org. Mond. Santé, 43, 1970, 891.

5.9.3. METODA KUNKEL

Se bazează pe precipitarea lipoproteinelor cu densitate joasă și foarte joasă (beta și prebeta) în prezență de fenol.

Reactivi. 10 *g* fenol și 120 *g* NaCl se dizolvă în 1000 *ml* apă agitîndu-se. Se lasă să se răcească și se filtrează. Se păstrează la frigider reînnoindu-se după 20 de zile.

Procedeu. Se amestecă 0,2 *ml* ser cu 3,6 *ml* reactiv și se citește extincția după 30 minute la 650 *nm* în cuve cu grosimea stratului de 1 *cm* față de un blanc alcătuit din 0,2 *ml* ser și 3,6 *ml* ser fiziologic. Se exprimă în unități convenționale obținute prin înmulțirea valorilor extincției cu 100. De exemplu $E = 0{,}36$; Kunkel = 36 unități.

Valori normale sînt sub 40 unități.

S-au făcut încercări de exprimare a rezultatelor în *mg* lipide/100 *ml* respectiv de dozarea turbidimetrică a lipidelor totale. În acest scop

Scanned with OKEN Scanner

0,2 *ml* ser se amestecă cu 6 *ml* din reactivul menţionat mai sus şi se citeşte transmisia după 30 minute la 650 *nm* faţă de un martor alcătuit din 0,2 *ml* ser amestecat cu 6 *ml* ser fiziologic. Se notează transmisia (nu extincţia).

$$mg \text{ lipide}/100\ ml = (100 - \text{Transmisia}) \times 19 + 370$$

La această formulă s-a ajuns pe cale empirică prin compararea datelor turbidimetrice obţinute la diverse seruri cu măsurătorile gravimetrice de lipide totale efectuate în aceleaşi seruri. Atragem însă atenţia că această formulă trebuie verificată în fiecare laborator prin dozări paralele de lipide cu o metodă gravimetrică sau cu metoda colorimetrică (reacţia sulfo-fosfo-vanilică). Metoda turbidimetrică poate fi utilizată dealtfel doar pentru o orientare rapidă.

BIBLIOGRAFIE

Kunkel, H. G. şi colab., Gastroenterology, 11, 1948, 449.

5.9.4. | SEPARAREA ELECTROFORETICĂ A LIPOPROTEINELOR

Determinarea lipoproteinelor serice se poate face prin separarea electroforetică pe hîrtie, pe foi de acetat de celuloză, pe agar şi pe agaroză. Separări excelente se obţin pe agaroză astfel încît electroforeza pe hîrtie a lipoproteinelor este astăzi o metodă depăşită. Redăm mai jos tehnica de separare electroforetică în gel de agaroză după metoda Noble cu unele perfecţionări aduse de Idu şi Cociumian şi cu unele modificări neesenţiale aduse în laboratorul clinicii Medicale I din Cluj.

Electroforeza în gel de agaroză a lipoproteinelor

Materiale: cameră umedă de electroforeză adaptată pentru lame de microscop, redresor, lame de microscop, integrator Zeiss Jena E.R.I. 10, dispozitiv-stanţă pentru decupat şanţuri în agaroză, hîrtie de filtru Whatman 1 sau 4 pentru stabilirea conexiunii între lame şi cuvele aparatului.

Soluţii

1. Soluţie tampon pentru cuve forţă ionică $\mu = 0{,}05$, $pH = 8{,}6$ (veronal 1,86 *g*, medinal 10,31 *g*, apă distilată ad 1000).

2. Soluţie tampon pentru prepararea agarozei $\mu = 0{,}025$ (soluţia precedentă diluată 1:1 cu apă distilată).

Scanned with OKEN Scanner

3. Soluţie agaroză 0,6 în tampon medinal $\mu = 0{,}025$ (soluţia 2). Agaroza se adaugă încet la soluţia tampon, amestecîndu-se mereu pe o baie de apă fierbinte. Se fierbe pînă la clarificare. Este bine ca balonul să fie acoperit pentru a se evita evaporarea.

4. Soluţia geloză (agar Difco-Noble) 0.6% în tampon medinal $\mu = 0{,}025$ (soluţia 2). Se prepară în acelaşi mod pe baie de apă la fierbere.

5. Amestec agaroză — agar. Se amestecă 80 *ml* soluţie agaroză cu 10 *ml* soluţie geloză (agar). Amestecul fierbinte este turnat în eprubete, care se astupă apoi cu parafilm sau cu celofan şi se păstrează la frigider.

6. Soluţie pentru fixarea lipoproteinelor de pe lamă: acid acetic 5% în apă distilată (sau acetat de uranil 0,5% în acid acetic 5%).

7. Colorant Sudan negru 0,1 *g* se dizolvă în 100 *ml* alcool 60% (alcool concentrat 61,3 *ml*-apă distilată 38,7 *ml*). Se fierbe într-un balon cu refrigerent cu reflux timp de 45 minute pe o baie. Se lasă să se răcească lent, apoi se filtrează într-o sticlă brună. Se păstrează la frigider. Se filtrează la fiecare întrebuinţare. Timp de conservare aproximativ 10 zile.

8. Soluţie pentru spălare: alcool 50% (alcool concentrat 51 *ml*, apă distilată 49 *ml*).

9. Soluţie albastru de bromfenol 1%, pentru evidenţierea frontului de migrare al albuminelor.

Procedeu. Se umple cuvele aparatului de electroforeză cu soluţie tampon $\mu = 0{,}05$ (soluţia 1). Se aşază în aparatul de electroforeză lame de microscop curate, degresate şi numerotate. Se toarnă pe fiecare lamă 3 *ml* soluţie agaroză — agar (5) fierbinte avîndu-se grijă ca lamele să fie perfect orizontale şi soluţia să acopere întreaga suprafaţă a lamelor. Se lasă să se răcească bine şi apoi se decupează cu stanţa un şanţ (lung de 15 *mm* şi lat de 1 *mm*) perpendicular pe lungimea lamei şi aflat la 1,5 *cm* de un capăt al acesteia.

Între timp se pregăteşte o baie la 46°C în care se introduc eprubete de hemoliză conţinînd cîte 0,2 *ml* din serurile de analizat. În fiecare eprubetă se adaugă apoi 0,4 *ml* amestec agaroză-agar (cald la 46°C) şi se amestecă bine cu serul.

Umplerea şanţului de pe lame cu amestecul conţinînd serul de analizat se face cu o pipetă fină efilată şi curbată, avînd grijă ca amestecul să nu treacă peste marginile şanţului.

Este recomandabil ca pe una din lame, alături de şanţul cu ser, să se decupeze un rezervor circular (2 *mm* diametru) în care să se in-

Scanned with OKEN Scanner

troducă o mică cantitate din amestecul conţinînd serul de analizat (6 părţi) şi soluţia de albastru de bromfenol (1 parte). Întrucît colorantul se fixează pe albuminele serice urmărirea deplasării petei de culoare indică frontul de migrare al albuminelor.

Se stabileşte conexiunea între lame şi cuvele aparatului cu ajutorul unor benzi de hîrtie de filtru Whatman 4 înmuiate în tampon. Este recomandabil ca distanţa între capetele lamei şi suprafaţa lichidului tampon din cuve să nu depăşească 2 *cm*. Bineînţeles se va avea grijă ca extremitatea lamei conţinînd şanţul cu serul de analizat să se afle la polul negativ, migrarea efectuîndu-se spre anod.

Se astupă camera umedă şi se porneşte curentul electric, realizîndu-se o intensitate de 4—5 mA pe lamă. De regulă după circa 90 minute se obţine o separare satisfăcătoare. (Se poate controla frontul de migrare al spotului colorat cu albastru de bromfenol).

După oprirea curentului electric lamele se fixează în acid acetic 5% timp de 30 minute, după care se scot din baia de acid acetic şi se acoperă cu hîrtie de filtru dublă, umectată cu apă şi se lasă să se usuce pînă a doua zi. (Acetatul de uranil asigură o mai bună fixare.)

Colorarea se face prin imersarea lamelor pe timp de două ore în soluţie de colorant proaspăt filtrată. Îndepărtarea excesului de colorat se face prin două spălări succesive de 2—3 minute cu alcool 50%. Se va urmări obţinerea unui fond incolor. Uscarea se face la temperatura camerei.

Prin acest procedeu se obţin 3 fracţiuni bine separate lipoproteinele alfa$_1$, lipoproteinele prebeta şi lipoproteinele beta, iar în cazuri particulare (postprandial sau în tipurile de hiperlipemie I şi V) se evidenţiază chilomicronii care rămîn în şanţuri şi nu migrează electroforetic.

Simpla examinare a lamelor este de multe ori suficientă pentru a stabili o anomalie a metabolismului lipidic (Exces al fracţiunii prebeta sau beta, prezenţa de chilomicroni etc.). Pentru obţinerea de rezultate cantitative se foloseşte însă un inscriptor ERI Zeiss Jena recurgîndu-se la o viteză de înscriere încetinită.

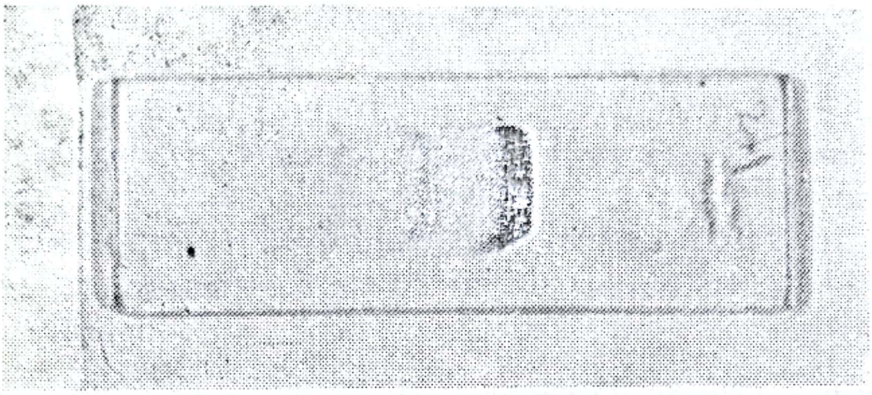
Valorile procentuale medii obţinute cu această metodă la subiecţii normali sînt de: 25—35% pentru fracţiunea alfa$_1$, 10—19% pentru fracţiunea prebeta şi 52—59% pentru fracţiunea beta.

Creşterea fracţiunii beta denotă o hipercolesterolemie iar creşterea fracţiunii prebeta denotă o hipertrigliceridemie endogenă.

(vezi tabel 3 şi fig. 34.35)

Scanned with OKEN Scanner

a)



b)

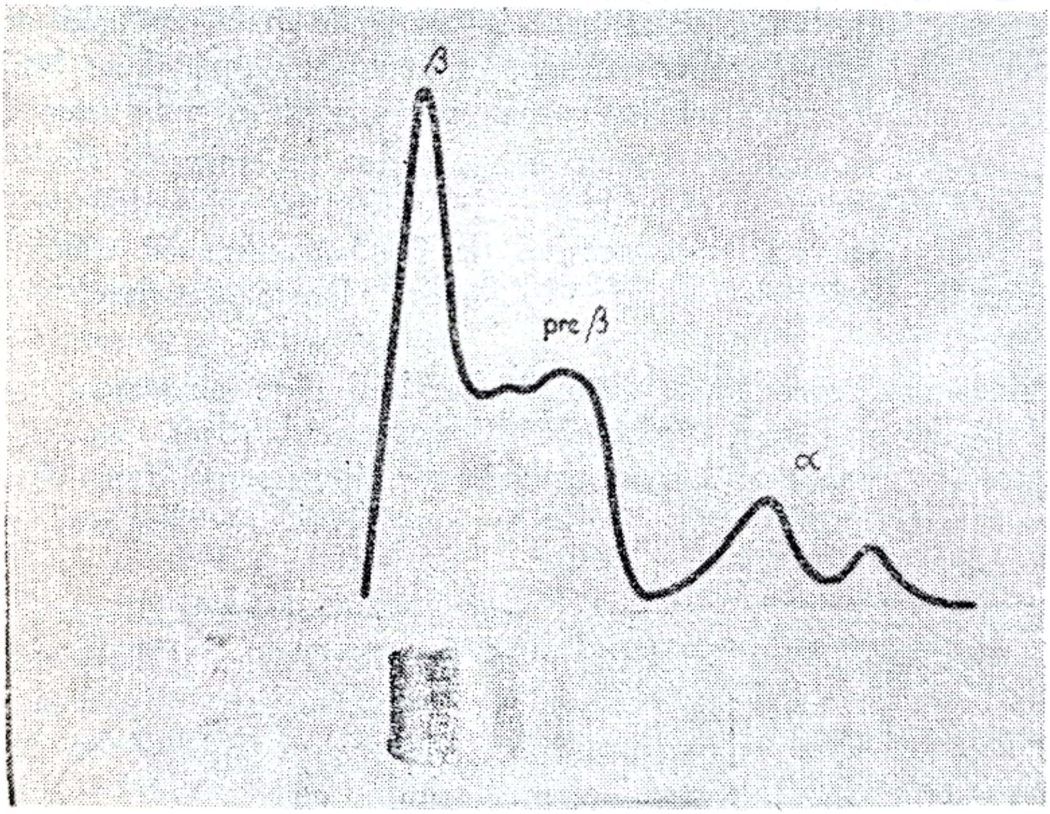


Fig. 34. Separarea electroforetică a lipoproteinelor serice în gel de agaroză: a) lipidogramă în agaroză, în ordinea vitezei de migrare: lipoproteine alfa, lipoproteine prebeta și lipoproteine beta. b) curba obținută prin fotometrare cu ajutorul integratorului Zeiss

Scanned with OKEN Scanner

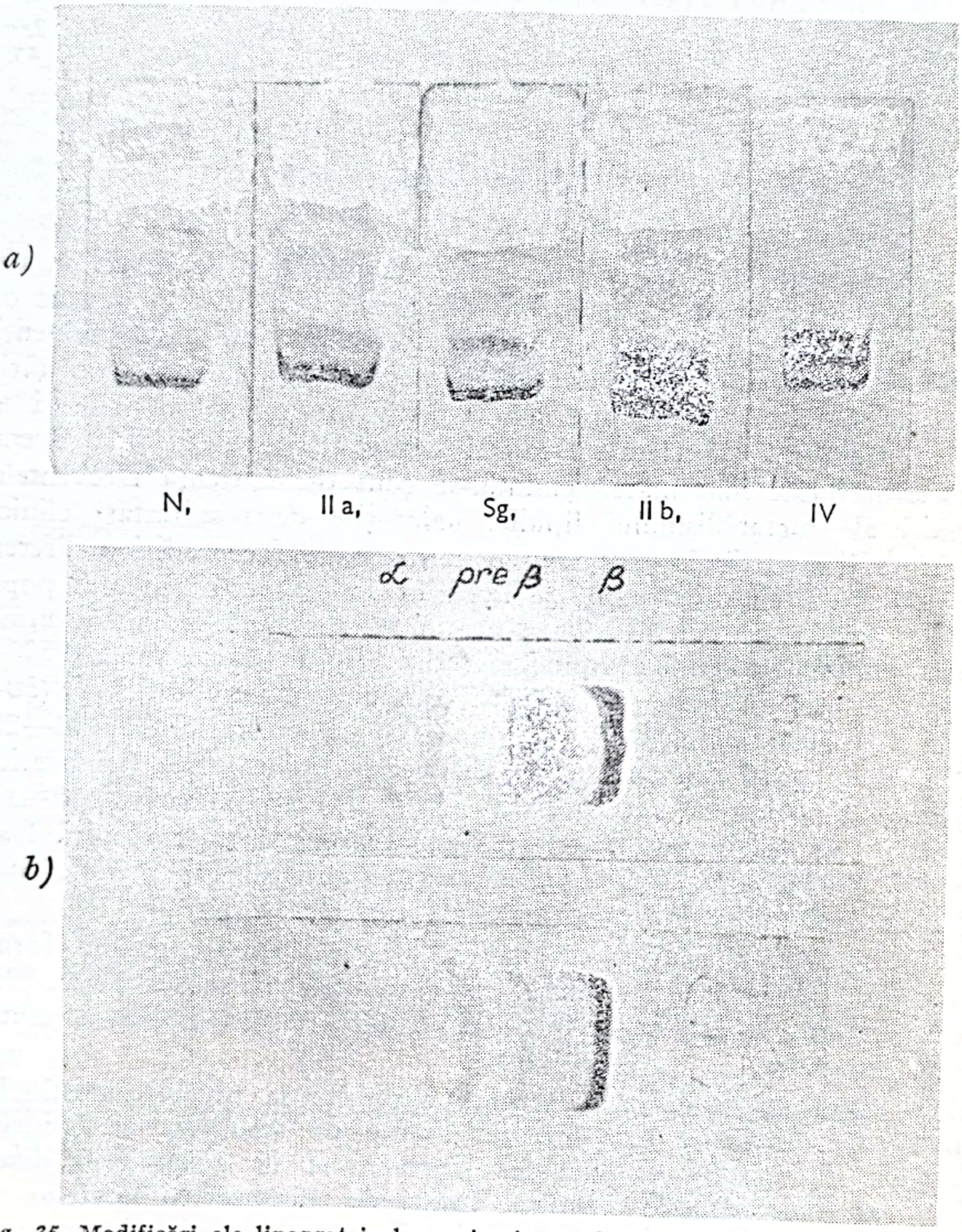


Fig. 35. Modificări ale lipoproteinelor serice în condiții patologice. a) Aspectul lipidogramei la normali (N), tipul IIa (creșterea fracțiunii beta), creșterea moderată a fracțiunii prebeta la un subiect supraponderal normolipemic (Sg), tipul II b (creșterea fracțiunii prebeta și beta) și la un subiect cu tipul IV (creșterea fracțiunii prebeta). b) Efectul tratamentului cu clofibrat într-o hiperlipemie de tip IV; sus, înainte de tratament; jos, după tratament.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Noble, R. P. Journal of Lipid Research, 9, 1968, 693; Idu, S., Cociumian, L. Revue Roumaine de Biochimie, 8, 1971, 219. Lózsa, A. Clin. Chim. Acta 53, 1974, 43.

5.10. | Interpretarea modificărilor lipidelor serice

Valorile normale. Nu există încă o unanimitate de păreri în privinţa valorilor normale ale lipidelor serice, al căror nivel plasmatic depinde de factori genetici precum şi de modul de viaţă şi de alimentaţie. Nivelul lipidelor serice este mai crescut la populaţiile din ţările dezvoltate avînd o alimentaţie mai bogată în grăsimi animale şi un ritm de viaţă mai accelerat. Dealtfel la aceste populaţii şi frecvenţa aterosclerozei este mai mare. Ţinîndu-se cont de existenţa frecventelor dereglări ale metabolismului lipidic, neînsoţite de manifestări clinice, dar cărora li se atribuie un potenţial aterogen, se face astăzi o diferenţiere netă între valorile medii ale lipidelor serice într-o anumită populaţie şi valorile normale. Pe baza acestor considerente admitem următoarele valori normale ale lipidelor serice: lipide serice totale: 500—700 *mg%*, avînd drept principale componente trigliceridele (50—150 *mg%*) fosfolipidele (150—220 *mg%*) şi colesterolul (150—220 *mg%*). Acizii graşi din compoziţia diferitelor lipide serice (trigliceride, fosfolipide şi colesterol esterificat), ajung la aproximativ 200—300 *mg%*, pe cînd acizii graşi liberi (A.G.L.) reprezintă doar o mică fracţiune de 12—16 *mg%* (0,5 *mEq/l*. Prezentăm în tabelul 11 date complimentare privind valorile normale ale lipidelor serice.

Transportul lipidelor în plasmă. Lipidele serice reprezintă forma de transport a acestor substanţe între organele de absorbţie sau de sinteză (intestin, ficat), organele de depozitare (ţesut adipos) şi ţesuturile consumatoare.

Transportul lipidelor alimentare absorbite la nivelul intestinului se face sub formă de *chilomicroni*. Forma de transport al lipidelor mobilizate din ţesutul adipos este reprezentată de *acizii graşi liberi* (AGL), iar *lipoproteinele* constituie forma de transport al lipidelor secretate de către ficat. Acest organ joacă un rol esenţial în metabolismul lipidic — captînd din circulaţie acizii graşi liberi, sîntetizînd trigliceride, colesterol şi fosfolipide şi formînd complexele lipoproteice. În tabelul 12 redăm în mod succint cîteva date referitoare la fracţiunile lipoproteice serice separate prin electroforeză în gel de agaroză.

Scanned with OKEN Scanner

VALORILE NORMALE ALE LIPIDELOR SERICE ŞI ALE UNOR PRODUŞI REZULTAŢI DIN METABOLISMUL LIPIDIC*

Lipide totale	500 — 700 *mg%*
Colesterol total	150 — 220 *mg%*
Colesterol liber	20 — 30% din total
Gliceride	50 — 150 *mg%*
Fosfolipide	150 — 220 *mg%* (5—10 *mg%* fosfor liposolubil)
din care:	
lecitină	66% din totalul de fosfolipide
sfingomielină	22% „ „ „ „
lizolecitină	9% „ „ „ „
cefalină	3% „ „ „ „
Acizi graşi totali (din esterii de colesterol din fosfolipide şi din trigliceride).	150— 350 *mg%* (aproximativ 12 *mEq/l*)
Acizi graşi liberi	12 — 16 *mg%* (aproximativ 0,5 *mEq/l*)
Glicerol	0,6—1,6 *mg%*
Corpi cetonici	1,5— 3 *mg%*

* Limitele de variaţie excesiv de largi admise de Wagener au fost restrînse după experienţa laboratorului nostru şi pe baza discuţiilor recente din literatură.

Wagener, H., *Methods for separation and determination of lipids in Lipids and Lipidoses* sub redacţia lui Schettler, G., Editura Springer, Berlin — Heidelberg — New York, 1967.

Scanned with OKEN Scanner

TABEL 13

DATE PRIVIND FRACȚIUNILE LIPOPROTEICE OBȚINUTE PRIN ELECTROFOREZĂ ÎN GEL DE AGAROZĂ*

Fracțiunea electroforetică	*Valori normale*	*Sinonime*	*Valoarea procentuală a principalilor constituenți*				*Origine*
			Proteine	*Trigliceride*	*Colesterol*	*Fosfolipide*	
Chilomicroni	Apar numai după un prînz bogat în lipide	Particule Sf > 400, particule primare, particule secundare	2	85	5	8	Originea alimentară (exogenă)
Beta — lipoproteine	52—60%	Lipoproteine cu densitate 1,006—1,063 și Sf 0—20; Lipoproteine cu densitate joasă	21	11	45	22	Endogenă (sinteză în ficat)
Prebeta — lipoproteine	Se admit valori ale fracțiunii prebeta de 10—19%	Liproproteine cu densitate mai mică de 1006 și Sf 20— — 400	8	50	19	18	Endogenă (sinteză în ficat)
Lipoproteine alfa$_1$	25—35%	Lipoproteine cu densitate mai mare de 1,063 Lipoproteine dense	50	8	17	22	Endogenă (sinteză în ficat).

* După Friedrickson, D. S. și Lees, R. S., Circulation 31, 1965, p. 321.
***După Oncley *Lipid protein interaction* in Folch., J. and Bauer, H., *Brain Lipids and Lipoproteins and Leucodystrophies*, Amsterdam, Elsevier, 1963, p. 1—17.

Scanned with OKEN Scanner

TABEL 13

TIPURI DE HIPERLIPEMIE DUPĂ FREDRICKSON. MODIFICĂRI ALE LIPIDELOR ŞI LIPOPROTEINELOR PLASMATICE

Tip	*Modificări ale fracţiunilor electroforetice*	*Modificări ale lipidelor*		*Raport Colesterol/ Trigliceride*	*Aspectul plasmei răcite*	*Frecvenţa*
		Colesterol	*Trigliceride*			
I	Hiperchilomicronemie	normal sau crescut	foarte mult crescute	<0,2 adeseori <0,1	smîntînos	foarte rară
II a	Hiperbeta	mult crescut	Normale	adeseori >2	Clar	frecventă
II b	Hiperbeta + creşterea prebeta	mult crescut	Crescute	Variabil	Clar sau uşor opalescent	frecventă
III	Aspect de „beta lată" (beta — lipoproteine care flotează)	mult crescut	Crescute	adeseori în jur de 1	de regulă opalescent	rară
IV	Hiperprebeta	moderat crescut	mult crescute	0,3—0,7	opalescent pînă la lactescent	frecventă
V	Creşterea chilomicronilor şi a funcţiunii prebeta	crescut	mult crescute	0,15—0,6	lăptos	rară

* De notat că diagnosticul hiperlipoproteinemiei de tip III nu se poate efectua doar din determinări de colesterol şi trigliceride sau pe baza aspectului electroforezei în agaroză a lipoproteinelor serice. Pentru un diagnostic de certitudine a acestui tip e nevoie de ultracentrifugare sau de electroforeză în gel de poliacrilamidă unde fracţiunea anormală migrează după beta — lipoproteine.

Scanned with OKEN Scanner

Scăderea lipidelor serice. Este rar întîlnită în patologie. Valori diminuate ale colesterolemiei se observă în insuficiențele hepatice grave cînd scade mai ales fracțiunea esterificată. Scăderi ale colesterolemiei se mai întîlnesc în hipertiroidism și în stări grave de denutriție. Valori ale colesterolemiei sub 100 *mg*/100 *ml* și ale lipidelor totale sub 250 *mg*/100 *ml* s-au descris într-o boală cu caracter familial denumită abetalipoproteinemie sau acantocitoză și în care există o perturbare cu caracter genetic în procesul de sinteză a betalipoproteinelor. Scăderea colesterolemiei sub 100 *mg* s-a observat și în deficitul familial de alfa$_1$ lipoproteine (Boala Tangier).

Creșterea lipidelor serice este mult mai frecvent întîlnită în practică. Apariția hiperlipemiilor (hiperlipoproteinemiilor) denotă existența unui dezechilibru între procesul de formare a lipoproteinelor și mecanismele de îndepărtare a acestora din circulație. În principiu, hiperlipemiile pot apare în caz de: a) aport alimentar crescut; b) sinteză crescută de lipide la nivelul ficatului; c) mobilizare crescută de AGL din țesutul adipos, urmată de o sinteză crescută de trigliceride, fosfolipide și colesterol în ficat; d) deficit în procesul de degradare lipolitică a trigliceridelor din lipoproteine (chilomicroni și prebeta) în urma unei activități diminuate a lipoproteinlipazei; e) deficit în procesul de catabolizare a betalipoproteinelor și de eliminare pe cale biliară a colesterolului; f) deficit în captarea și utilizarea lipidelor la nivelul țesuturilor.

Hiperlipemii și hipercolesterolemii secundare se întîlnesc în diabetul zaharat, sindrom nefrotic, alcoolism și hipotiroidism. Creșteri ale colesterolemiei se pot întîlni în obstrucții ale căilor biliare.

Hiperlipoproteinemii cu caracter familial evoluează cu creșteri marcate fie ale colesterolului seric (hipocolesterolemii esențiale) sau ale trigliceridelor (hipertrigliceridemii esențiale). Pornindu-se de la hiperlipoproteinemiile cu caracter familial, Fredrickson și Lees au încercat o clasificare a acestor anomalii în funcție de fracțiunea electroforetică a lipoproteinelor care este anormal crescută. În tabelul 13 reproducem particularitățile biochimice ale celor 5 tipuri de hiperlipemie.

Această clasificare nu se limitează doar la hiperlipoproteinemiile cu caracter familial putînd fi aplicate la orice hiperlipemie. O evaluare aproximativă a tipurilor de hiperlipoproteinemie poate fi efectuată și fără electroforeză sau ultracentrifugare, pe baza aspectului serului răcit la +4°C și a dozărilor de colesterol și trigliceride. Redăm în figura 36 un astfel de procedeu recomandat de Havel.

Deși stabilirea tipurilor de hiperlipoproteinemie constituie un progres în studiul dereglărilor metabolismului lipidic, nu este recoman-

Scanned with OKEN Scanner

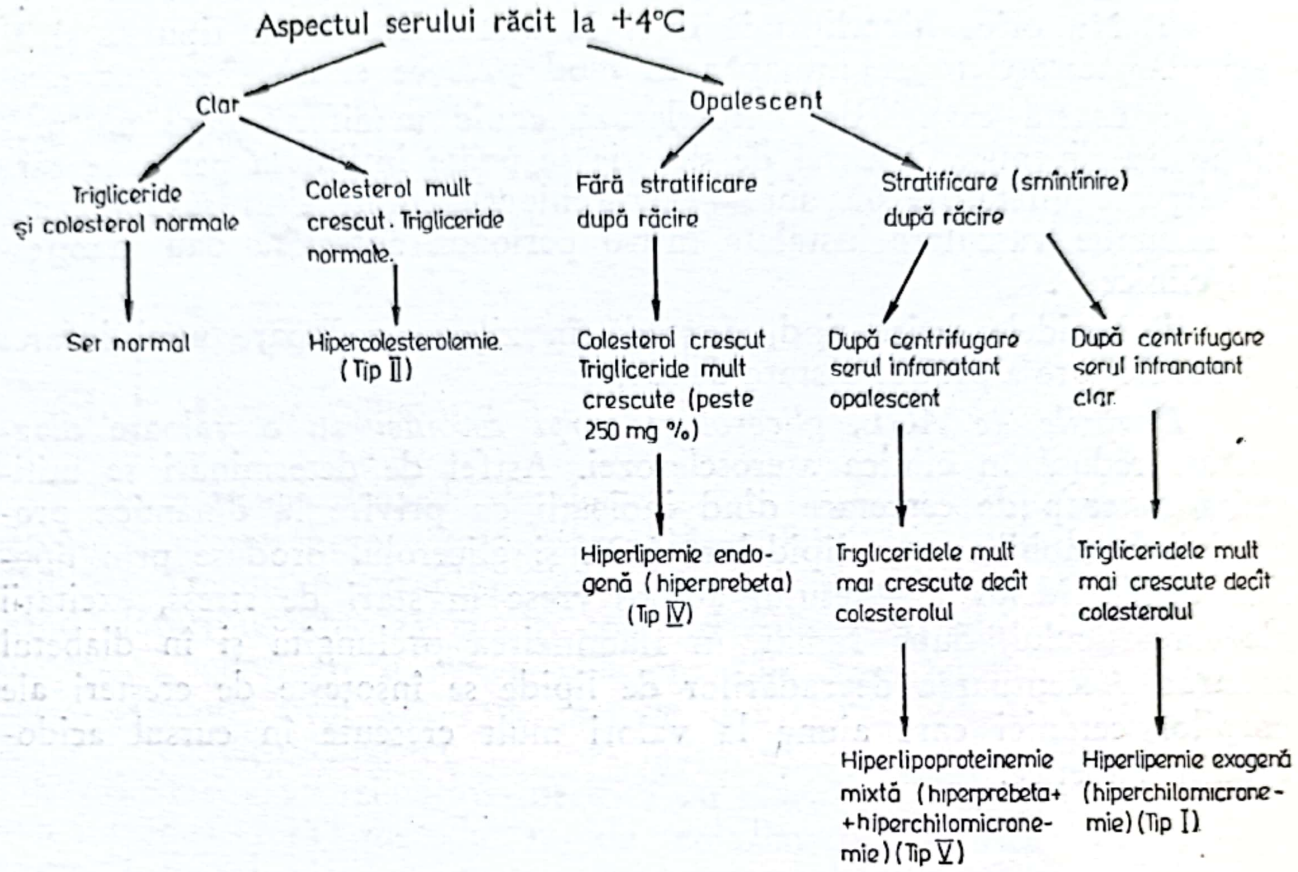


Fig. 36. Evaluarea hiperlipoproteinemiilor în lipsa posibilităţilor de separare electroforetică a lipoproteinelor (După R. J. Havel, Atherosclerosis, 1970, 11, p. 3).

dabil ca medicul să se oprească la stabilirea tipului de hiperlipemie indicat de laborator, ci să încerce stabilirea etiopatogeniei hiperlipemiei. Aceasta cu atît mai mult cu cît boli diferite se pot asocia cu acelaşi tip de hiperlipoproteinemie.

Hiperlipemiile şi ateroscleroza. Cercetări experimentale şi epidemiologice, precum şi observaţii clinice şi de laborator sugerează o legătură între perturbarea metabolismului lipidic şi ateroscleroză. Pe baza acestor date se consideră că un nivel al colesterolului de peste 240 *mg*/100 *ml* şi al trigliceridelor serice de peste 150 *mg*/100 *ml* (sau lipide totale peste 800 *mg*/100 *ml*) reprezintă un factor de risc pentru apariţia leziunilor vasculare de tip aterosclerotic. Neconcordanţele între datele clinice şi cele de laborator s-ar putea explica în modul următor:

a) Existenţa unei hiperlipemii la subiecţii clinic sănătoşi; Astfel de subiecţi pot fi însă consideraţi ca aflîndu-se în stadii incipiente de dezvoltare a aterosclerozei sau avînd un potenţial de evoluţie spre ateroscleroză.

Scanned with OKEN Scanner

b) Nu orice hiperlipemie duce la ateroscleroză. În tipul I şi V leziunile aterosclerotice nu apar în mod precoce şi nu sînt frecvente.

c) Există cazuri de ateroscleroză clinic manifestă care nu prezintă hiperlipemie. O astfel de situaţie se poate întîlni la persoane care au depăşit vîrsta de 65 ani — cînd hiperlipemiile tind să regreseze, iar leziunile vasculare instalate într-o perioadă anterioră dau manifestări clinice .

d) Lipidele serice tind să scadă în zilele următoare unui infarct miocardic care a produs o stare de şoc.

Dozările de AGL, glicerol şi corpi cetonici au o valoare diagnostică redusă în clinica aterosclerozei. Astfel de determinări se utilizează în scop de cercetare dînd indicaţii cu privire la dinamica procesului de mobilizare a lipidelor. AGL şi glicerolul produse prin lipoliza trigliceridelor din ţesutul adipos cresc în stări de stress, excitaţii ale simpaticului, după fumat, în flămînzirea prelungită şi în diabetul zaharat. Accentuarea degradărilor de lipide se însoţeşte de creşteri ale corpilor cetonici care ajung la valori mult crescute în cursul acidocetazei diabetice.

BIBLIOGRAFIE

Fredrickson, D. S., Levy, R. I., Lees, R. S., New Engl. J. Med., 276, 1967, 34. Moga, A., Cucuianu, M., Orha, I., Vlaicu, R., *Hipertensiunea arterială şi ateroscleroza*, Ed. medicală, Bucureşti, 1970; Nelson, G. I., *Blood Lipids and Lipoproteins Quantitation, Composition and Metabolism*, Ed. Interscience, New York—London—Sydney—Toronto, 1973; Schettler, G., *Lipids and Lipidoses*, Ed. Springer, Berlin—Heidelberg—New York, 1967; Cucuianu, M., Opincaru, A., Hărăguş, Şt., Clujul Medical, 45, 1972, 661.

5.11. | Separarea lipidelor prin cromatografie în strat subţire

Prin cromatografia în strat subţire a extractului lipidic (vezi pag. 172) se pot obţine în funcţie de solventul folosit separări ale fosfolipidelor (fosfatidil-etanolamină, lecitină, sfingomieline, lizolecitină) sau ale componentelor lipidelor nepolare (esteri de colesterol, triglicride, digliceride, colesterol liber). S-a reuşit chiar şi o fracţionare a esterilor de colesterol în funcţie de acizii graşi care intră în compoziţia lor. Deşi relativ simple şi precise aceste metode nu şi-au găsit încă o aplicabilitate diagnostică astfel încît utilizarea lor este limitată la probleme de cercetare. Din acest motiv indicăm doar bibliografia.

Scanned with OKEN Scanner

Gluck, L., Kolovich, V. M., Brody, S. I., J. Lipid. Res., 7, 1966; 570; Wagner, H., Nature (London), 205, 1965, 386; Berlin, R., Oldfelt, C. O., Vikrot, O., Acta med. Scand., 185, 1969, 427; Vikrot, O., Acta Med. Scand., 1965, suppl. 435; Biezenski, I. I., Pomerance, W., Goodman, I., J. Chromatography 38, 1968, 148; Kates, M., *Techniques of Lipidology.*, Ed. Academic Press, New York, 1972.

6. GLUCIDELE ŞI METABOLIŢII LOR

6.1. Dozarea glucozei

Multă vreme dozările de glucoză s-au bazat pe proprietatea reducătoare a acestei hexoze (reducerea hidroxidului cupric, reducerea fericianurii). Trebuie precizat însă că substanţele reducătoare din sînge cuprind alături de glucoză şi alţi compuşi cum ar fi glutationul, acidul ascorbic, glicuronizii şi acidul uric etc. Din acest motiv valorile glicemiei obţinute prin astfel de metode sînt cu aproximativ 10 *mg* (şi în unele condiţii chiar cu 20 *mg*) mai ridicate decît rezultatele obţinute prin metoda enzimatică specifică cu glucozooxidază. În ultimii ani s-au introdus însă metode rapide colorimetrice bazate pe reacţii directe între glucoză şi un cromogen (orto-toluidină, antronă) şi care dau rezultate mai apropiate de valorile obţinute prin dozarea enzimatică specifică a glucozei. Întrucît nu există încă o metodă universal acceptată şi ţinînd cont de posibilităţile diverselor laboratoare, în cele ce urmează vom prezenta mai multe metode de dozare a glicemiei.

Pentru a preveni glicoliza în sîngele recoltat este recomandabil ca recoltarea sîngelui pentru determinări de glucoză să se facă pe florură de sodiu (aproximativ 10 *mg/ml* sînge).

6.1.1. METODA ENZIMATICĂ

Principiu. Glucoza în prezenţă de ATP şi hexokinază este fosforilată de glucozo-6-fosfat conform reacţiei:

$$\text{Glucoză} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg^{2+},\ K^{+}]{\text{Hexokinază}} \text{G} - 6 - \text{P} + \text{ADP}$$

Glucozo-6-fosfatul în prezenţa de $NADP^+$ şi sub acţiunea enzimatică a glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (G-6-PDH) se transformă în 6-fosfogluconat (6-PG), conform reacţiei

$$\text{G} - 6 - \text{P} + NADP^+ \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} 6 - \text{PG} + NADPH + H^+$$

Scanned with OKEN Scanner

Cantitatea de NADPH care rezultă este echivalentă cu cantitatea de glucoză intrată în reacţie. Se măsoară deci extincţia NADPH-ului rezultat, la 340 *nm*, la 334 *nm* sau la 366 *nm* (liniile Hg).

Reactivi. 1) Soluţie tampon, *pH* 7,5 (trietanolamină 0,3 *M* şi $MgSO_4$ 4 *mM*). 2) Soluţie NADP 12 *mM*. 3) ATP 16 *mM*. 4) Amestec hexokinază (HK) glucozo-6-fosfat dehidrogenază (G-6-PDH). Se prepară o soluţie de hexokinază 1 *mg/ml* şi o soluţie de glucozo-6-fosfat dehidrogenază 2 *mg/ml*. Se amestecă apoi 1 *ml* soluţie HK cu 1 *ml* soluţie G-6-PDH. 5) Acid percloric ($HClO_4$) 0,33 *M* (2,87 *ml* $HClO_4$ 70% se diluează cu apă distilată la 100 *ml*). 6) Acid benzoic 0,2% (2 g acid benzoic se solvă în 1000 *ml* apă distilată). 7) Amestecul de reacţie: se păstrează maximum o zi, de aceea se prepară în cantităţile necesare în funcţie de numărul determinărilor.

Numărul determinărilor	*Tampon (ml)*	NADP (µl)	ATP (µl)	HK/G-H-PDH (µl)
1—2	1,0	40	40	10
3—5	2,5	100	100	20
6—10	5,0	200	200	50

Tehnica. În două eprubete de centrifugă se pipetează:

Reactivi (ml)	*Probă*	*Martor reactivi*
Acid percloric	0,5	0,5
Sînge	0,05	—
Apă distilată	—	0,05

Se agită 30 secunde pentru amestecare, se centrifughează 1 minut la 3000 r.p.m. Se pipetează:

Reactivi (ml)	*Probă*	*Martor reactivi*
Supernatant	0,125	0,125
Amestec de reacţie	1,25	1,25

Se agită 30 *s*, se lasă în repaus 20 *min* la 20—25°C. Se citeşte extincţia probei şi a martorului faţă de apă distilată la 334, 340 *nm*, sau 366 *nm*, în cuve de 1 *cm*. Extincţia martorului trebuie să fie zero sau aproape zero.

Calcul. 334 $nm = (E_p - E_M) \cdot 357 = mg$ glucoză/100 *ml*

340 $nm = (E_p - E_M) \cdot 344 = mg$ glucoză/100 *ml*

366 $nm = (E_p - E_M) \cdot 650 = mg$ glucoză/100 *ml*

Valori normale: 50—95 mg glucoză/100 *ml*.

Observaţii. 1. Cifra cu care se înmulţeşte $E = E_p - E_M$ a fost stabilită cu ajutorul unei curbe executată în felul următor: glu-

Scanned with OKEN Scanner

coza se aduce la pondere constantă prin păstrare într-un exicator de vid, pe pentaoxid de fosfor (P_2O_5). Se prepară apoi o soluţie standard (1000 *mg* glucoză/100 *ml*): 200 g glucoză se solvă în 200 *ml* soluţie acid benzoic 0,2%. Se pregătesc următoarele amestecuri:

Soluţie standard glucoză (*ml*)	50	40	20	10
acid benzoic 0,2% (*ml*)	50	60	80	90
Cantitate de glucoză (*mg*/100 *ml*)	500	400	200	100

Din fiecare amestec se ia o cantitate de 0,1 *ml*, se adaugă 1 *ml* amestec de reacţie, se agită, se lasă în repaus 20 minute la 20—25°C. Se citeşte extincţia faţă de apă distilată la 340 *nm*, sau 366 *nm*, 334 *nm* în cuvă de 1 *cm*. Se calculează pentru fiecare din cele 4 probe cîte un factor după formula $(E_P—E_M)\cdot F = mg$ glucoză/100 *ml*. Se face apoi media aritmetică a celor 4 factori obţinînd cifra din formulă (în cazul fotometrului Eppendorf: 357, 344, 650 pentru lungimile de undă respectiv 334 *nm*, 340 *nm* şi 366 *nm*.)

2) În caz că se dispune de microcuve se vor reduce volumele de lucru de 2,5 ori pornind cu 20 *µl* ser.

3) La deproteinizare cu acid percloric se va spăla de mai multe ori conţinutul pipetei cu soluţie de acid. În cazul adaptării metodei ultramicroanalitice de la punctul 2 se va recolta sînge capilar direct în micropipetă, pe urmă se goleşte imediat şi se spală cu acid percloric.

BIBLIOGRAFIE

Ashwell, G. În „Methods in Enzymology" Ed. N. O. Kaplan şi S. P. Colowick Acad. Press New York, *3* (1957) 85.

6.1.2. DOZAREA COLORIMETRICĂ CU REACTIV ARSENOMOLIBDENIC

Principiu. Metoda se bazează pe reducerea hidroxidului cupric de către glucoză. Oxidul cupros care rezultă reduce la rîndul său reactivul arsenomolibdenic dezvoltînd o culoare albastră a cărei intensitate se măsoară la 710 *nm*.

Reactivi. 1) Reactivul cupric este format din două soluţii A şi B care se amestecă extemporaneu în proporţie de 25 *ml* reactiv A şi 1 *ml* reactiv B.

a) Reactivul A: 25 *mg* Na_2CO_3 anhidru, 25 g sare Seignette $KNaC_4O_6H_4\cdot 4H_2O$, 2 g $NaHCO_3$, 200 g Na_2SO_4 anhidru, apă distilată pînă la 1000 *ml*. Temperatura soluţiei nu trebuie să scadă sub

20°C. Sedimentul format prin păstrarea soluției mai multe zile, se îndepărtează prin filtrare.

b) Reactivul B: 15 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, apă distilată pînă la 100 *ml*. Se adaugă 1—2 picături H_2SO_4 concentrat.

2) Reactivul arsenomolibdenic: 25 g molibdat de amoniu $(NH_4)_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 450 *ml* apă distilată, sub agitare continuă și răcire se adaugă 21 *ml* H_2SO_4 concentrat, 3 g $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$, dizolvate în prealabil în 25 *ml* apă distilată. Soluția se păstrează 24 ore la 37°C, apoi se transferă într-o sticlă cu dop rodat de culoare brună.

3) Soluție de sulfat de zinc 5%: 5 g $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$, apă distilată pînă la 100 *ml*.

4) Soluție de hidroxid de bariu 0,3 *N*: 47,34 g $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$, apă distilată pînă la 1000 *ml*. Soluțiile (3) și (4) trebuie astfel ajustate încît 5 *ml* soluție de $ZnSO_4$ 5% să se titreze cu 4,7—4,8 *ml* soluție $Ba(OH)_2$ 0,3 *N* în prezență de fenolftaleină ca indicator.

5) Soluție glucoză 0,01%. Se prepară proaspătă zilnic chiar înaintea începerii determinărilor, dintr-o soluție 1%.

a) Soluție glucoză 1%: 1 g glucoză, apă distilată pînă la 100 *ml*. *b*) Soluție glucoză 0,01%: 1 *ml* soluție glucoză 1%, apă distilată 100 *ml* (0,4 *ml* din această soluție conține 40 μg glucoză).

Tehnica. 1) 0,1 *ml* sînge se diluează cu 1,5 *ml* apă și 0,2 *ml* $Ba(OH)_2$ 0,3 *N*. Se agită bine, iar cînd amestecul devine brun se adaugă 0,2 *ml* soluție $ZnSO_4$ 5%. Amestecul se lasă în repaus cîteva minute pentru ca precipitarea proteinelor să fie completă, după care se supune unei centrifugări timp de 5 minute la 3000 r.p.m. 2) În continuare se pregătesc 3 eprubete și se lucrează după schema de mai jos:

	Probă în alb	*Probă*	*Standard*
Supernatant	—	0,4 *ml*	—
Glucoză 0,01%	—	—	0,4 *ml*
Apă distilată	0,4 *ml*	—	—
Reactiv cupric	0,4 *ml*	0,4 *ml*	0,4 *ml*

Se agită bine. Se fierb pe baia de apă timp de 20 minute. Se răcesc apoi la un curent de apă.

reactiv arsenomolibdenic	0,4 *ml*	0,4 *ml*	0,4 *ml*
apă distilată	8,8 *ml*	8,8 *ml*	8,8 *ml*

Culoarea albastră a probei se citește la 710 *nm*, în cuva de 1 *cm*, față de proba în alb, notîndu-se extincția.

Calcul. Întrucît standardul conține 0,04 *mg* glucoză, iar 0,4 *ml* supernatant corespunde la 0,02 *ml* sînge (0,1 *ml* sînge a fost diluat cu apă și reactivi de precipitare la 2 *ml*), rezultă că pentru a afla canti-

Scanned with OKEN Scanner

tatea de glucoză pe 100 *ml* sînge, raportul dintre extincţia probei (E_p) şi extincţia standard (E_S) trebuie înmulţit cu 0,04 şi cu 5000. Deci:

$$\text{glucoză } (mg)/100\ ml \text{ sînge} = \frac{E_P}{E_S} \times 0{,}04 \times 5000$$

sau după simplificare:

$$\text{glucoză } (mg/100\ ml \text{ sînge}) = \frac{E_P}{E_S} \times 200$$

Valori normale: 80—100 *mg*/100 *ml* sînge.

Observaţii. În locul hidroxidului de bariu se poate folosi hidroxid de sodiu 0,06 *N* evitîndu-se ajustarea soluţiei de hidroxid de bariu. În această variantă 0,02 *ml* sînge şi respectiv 0,02 *ml* soluţie standard glucoză 200 *mg*/100 *ml* se amestecă cu 0,5 *ml* apă distilată, 0,5 *ml* NaOH 0,06 *N* şi 0,5 ml $ZnSO_4$ 1%. După centrifugare se iau cîte 1 *ml* din supernatant se fierb 10 *min* cu 1 *ml* reactiv cupric, iar după răcire se adaugă 1 *ml* reactiv arsenomolibdenic şi se fotometrează.

$$mg \text{ glucoză}/100\ ml = \frac{\text{E probei}}{\text{E standard}} \times 200$$

O altă variantă (Dabels şi colab.) deproteinizează 0,1 *ml* sînge cu 0,2 *ml* wolframat de sodiu 10% şi 1,7 *ml* din soluţia izotonă alcătuită prin amestecarea a 320 *ml* $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ 3% şi 30 *ml* $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 7%.

BIBLIOGRAFIE

Nelson, I., J. Biol. Chem., 153 (1944) 375. Somogy, M., J. Biol. Chem., 160 (1945) p. 69 şi 195 (1952) p. 19. Dabels, I., Best, G., Disch, I., J. Biol. Chem., 315 (1961) 212.

6.1.3. | METODA COLORIMETRICĂ CU ANTRONĂ

Principiu. Prin deshidratarea cu acid sulfuric, hexozele trec în derivaţi de furfurol care formează apoi produşi de condensare cu antrona. Complexul colorat care se formează se fotometrează la 620 *nm*.

Reactivi. 1) Acid tricloracetic 5%. 2) Reactiv antronă: la 280 *ml* apă distilată se adaugă cu precauţie 720 *ml* acid sulfuric concentrat. După răcirea amestecului se adaugă 500 *mg* antronă şi 10 g tiouree şi se încălzeşte la 80°C pe baie de apă pînă la dizolvare. Reactivul se păstrează la +4°C timp de cîteva săptămîni. 3) Soluţie standard de glucoză 200 *mg*/100 *ml*.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica. La 0,9 *ml* acid tricloroacetic 5% se adaugă 0,1 *ml* sînge. După filtrare sau centrifugare se iau 0,5 *ml* filtrat (respectiv supernatant) și se amestecă rapid cu 5 *ml* reactiv antronă și se încălzește timp de 15 minute pe o baie de apă la fierbere. În paralel se prepară o probă în alb conținînd 0,1 *ml* apă distilată în loc de sînge și o probă standard conținînd 0,1 *ml* dintr-o soluție de glucoză 200 *mg*/100 *ml*. Proba în alb și proba standard se lucrează în același mod ca și proba de sînge. După răcire se fotometrează la 620 *nm* în cuve de 1 *cm*, față de proba în alb.

$$\textit{Calcul.}\ \frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 200 = mg \text{ glucoză}/100\ ml \text{ sînge}$$

BIBLIOGRAFIE

Roe, I. H., J. Biol. Chem., 212 (1955), p. 325.

6.1.4. | METODA COLORIMETRICĂ CU ORTO-TOLUIDINĂ

Principiu: Prin încălzirea în mediu acetic glucoza formează cu o-toluidina un complex colorat care se fotometrează la 630 *nm.*

Reactivi. 1) Acid tricloracetic 3%. 2) Reactiv o-toluidină: se dizolvă 1,5 *g* tiouree în 200 *ml* acid acetic glacial încălzindu-se ușor. Se adaugă 60 *ml* o-toluidină, se amestecă și se aduce la 1000 *ml* cu acid acetic glacial. Se păstrează în sticlă brună. 3) Soluție stoc standard de glucoză. Se dizolvă 1 *g* glucoză pură anhidră în 100 *ml* dintr-o soluție saturată de acid benzoic. Se păstrează nelimitat. 4) Soluție standard de lucru. Se diluează 1 *ml* din soluția precedentă la 100 *ml* cu soluția saturată de acid benzoic. Soluția se păstrează bine, dar se recomandă reînnoirea săptămînală pentru a minimaliza modificările produse de evaporare.

Tehnica. Se amestecă 0,1 *ml* sînge cu 1,9 *ml* acid tricloracetic 3% și după 5 *min* se centrifughează. Se pipetează 1 *ml* supernatant într-o eprubetă uscată. În paralel se pregătesc o probă în alb conținînd 1 *ml* apă distilată și un standard conținînd 1 *ml* soluția standard de lucru (reactiv 4). În fiecare din cele 3 eprubete se adaugă 5 *ml* reactiv o-toluidină și se agită. Eprubetele astupate se încălzesc pe baia de apă la fierbere timp de 10 minute. Se răcesc la jet de apă timp de 4 minute. Se citesc extincțiile probei și standardului față de proba în alb la 630 *nm.*

$$\textit{Calcul.}\ \frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 200 = mg \text{ glucoză}/100\ ml \text{ sînge}$$

Valori normale: 60—100 *mg*/100 *ml* sînge, 45—75 *mg*/100 *ml* lichid cefalorahidian.

Scanned with OKEN Scanner

Observaţii. Se va folosi doar o-toluidină cît mai pură. Dacă o-toluidină este roşietică se va distila. În cazul lichidului cefalorachidian se vor folosi 0,4 *ml* + 1,6 *ml* acid tricloracetic. Se procedează în continuare ca şi în cazul sîngelui, împărţindu-se rezultatul final la 4.

BIBLIOGRAFIE

Dubowski, K. M., Clin. Chem., 8 (1962) 215. Ityvärinen, A., Nikkilä, E. A., Clin. Chim. Acta, 7 (1962) 140.

6.1.5. DOZAREA TITRIMETRICĂ (Metoda Hagedorn şi Jensen)

Principiu. Metoda se bazează pe reducerea fericianurii de potasiu de către glucoza prezentă în filtratul de sînge deproteinizat în prealabil, prin încălzire cu un amestec de sulfat de zinc şi hidroxid de sodiu. Fericianura în exces eliberează iodul dintr-o soluţie de iodură de potasiu în mediu acid. Iodul eliberat este titrat apoi cu o soluţie de tiosulfat de sodiu în prezenţă de amidon ca indicator.

Reactivi. 1) Sulfat de zinc 0,45%: 1,13 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, apă distilată pînă la 250 *ml*. Se păstrează aproximativ 3 săptămîni. Soluţia trebuie refăcută dacă formează depozit. 2) Soluţie de hidroxid de sodiu 0,1 *n*: 4 *g* NaOH pelete, apă distilată pînă la 1000 *ml*. 3) Soluţie 0,01 *n* de fericianură de potasiu: 0,329 *g* $K_3/Fe(CN)_6/$ purificată, apă distilată pînă la 100 *ml*. Purificarea fericianurii de potasiu se face în felul următor: 80 *g* de fericianură de potasiu se solvă în 100 *ml* apă adusă în fierbere şi se filtrează prin hîrtie Whatman nr. 1 (în lipsa acesteia prin hîrtie de filtru cu pori foarte fini) care a fost spălată în prealabil prin trecere de apă fiartă. Filtratul se răceşte şi se lasă peste noapte în frigider pentru cristalizare. Cristalele se filtrează printr-o pîlnie Büchner. Se repetă recristalizarea ca mai sus. Se usucă într-un exicator. În timpul acestui proces cristalele de fericianură trebuie ferite de lumina solară. Păstrarea lor se face la întuneric. 4) Soluţie de carbonat de sodiu 2,12%: 21,2 g Na_2CO_3 (anhidru), apă distilată pînă la 1000 *ml*. Se păstrează indefinit. 5) Soluţie de sulfat de zinc 7,5% în soluţie de NaCl 25%: 15 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 g NaCl, apă distilată pînă la 200 *ml*. Soluţia trebuie reînnoită în momentul în care se formează depozit. 6) Iodură de potasiu 7,5% în soluţie NaCl 25%: 0,75 *g* KI, 10 *ml* NaCl 25%. Se prepară proaspătă. 7) Soluţie de NaCl 25%: 250 *g* NaCl, apă distilată pînă la 1000 *ml*. 8) Soluţie de acid acetic 3%: 3 *ml* acid acetic glacial p.a., apă distilată pînă la 100 *ml*. 9) Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,005 *n:* a) Soluţie de tiosulfat de sodiu: 0,1 *n*: 26 *g* $Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$, apă distilată proaspăt adusă la

Scanned with OKEN Scanner

fierbere ad 1000 *ml*, 2 picături NaOH 40%. Se lasă 2—3 zile să stea în repaus la întuneric, după care se stabileşte titrul soluţiei (vezi prepararea soluţiilor). Soluţia se prepară proaspătă o dată pe lună. b) 5 *ml* soluţie $Na_2S_2O_4$ 0,1 *n*. se diluează cu apă demineralizată sau distilată la 100 *ml*. Se prepară proaspătă. 10) Soluţie de amidon solubil 1% în soluţie saturată de NaCl: 1 g amidon solubil, 2—3 *ml* NaCl soluţie saturată. Se face o pastă care este adăugată în 80 *ml* soluţie saturată de NaCl adusă la fierbere. Pasta rămasă pe pereţii mojarului se spală cu 10 *ml* soluţie saturată de NaCl şi se adaugă peste cei 80 *ml*. Se fierbe 1 minut. Se răceşte. Se aduce la 100 *ml* cu soluţie saturată de NaCl. Se păstrează indefinit.

Verificarea reactivilor. Toţi reactivii folosiţi trebuie să fie liberi de iod. Pentru a ne convinge de acest lucru se amestecă toţi reactivii cu excepţia fericianurii de potasiu, în cantităţi folosite la determinarea glucozei. Se adaugă cîteva picături de amidon. Nu trebuie să apară o culoare albastră. Dacă totuşi apare, se verifică fiecare reactiv în parte şi cel care conţine iod liber trebuie înlocuit.

Tehnica. 1. Îndepărtarea proteinelor. Într-o eprubetă se amestecă 5 *ml* soluţie de $ZnSO_4$ 0,45% şi 1 *ml* soluţie NaOH 0,1 *N*. Se obţine astfel hidroxid de zinc. Se adaugă 0,1 *ml* de sînge (sau 0,2 *ml* LCR). Se prepară un martor în aceleaşi condiţii omiţînd sîngele (sau LCR-ul). Se introduce într-o baie de apă la fierbere exact 3 minute. Se filtrează printr-o hîrtie Whatman nr. 41 (cu ϕ 5,5 *cm*), eprubeta se spală de 2 ori cu cîte 3 *ml* apă distilată fiartă trecînd şi această apă peste filtru. În loc de filtrare putem centrifuga 10 minute la 3000 r.p.m. într-o centrifugă de laborator.

2. Efectuarea reacţiei. a) Reducerea fericianurii de potasiu: filtratului (supernatantului) i se adaugă 1,0 *ml* soluţie de fericianură de potasiu 0,33% cu ajutorul unei pipete Ostwald—Folin. Se adaugă apoi 1 *ml* de soluţie de carbonat de sodiu 2,12%. Se încălzeşte în baia de apă adusă la fierbere exact 15 minute. Se răceşte imediat. Dacă fericianura s-a decolorat, se adaugă 1,0 *ml* de fericianură de potasiu 0,33% şi se mai încălzeşte 15 minute. Se răceşte.

b) Eliberarea iodului. Se adaugă 2 ml $ZnSO_4$ 7,5% în soluţie de NaCl 25%, 1 *ml* de iodură de potasiu 7,5% în soluţie de NaCl 25% şi se spală tubul spre interior cu 2 *ml* acid acetic 3%.

3. Titrarea iodului eliberat se face imediat cu ajutorul unei soluţii de tiosulfat de sodiu 0,005 *N* dintr-o microbiuretă de 2 *ml*. Se adaugă tiosulfat pînă la o culoare galben-pai. Se adaugă 5 picături de soluţie de amidon şi se continuă titrarea cu tiosulfat de sodiu (cca încă 0,01 *ml*) pînă la dispariţia culorii albastre. Blancul ne oferă o măsură a impurităţilor reducătoare din reactivi. Dacă nu există impurităţi reducătoare, titrarea blancului trebuie să se facă cu 2 *ml*. În

practică este admisibilă o valoare mai mare de 1,92 *ml*. Dacă ca este mai mică de 1,92 atunci reactivii trebuie reînnoiţi.

Calcul

glucoză (*mg*/100 *ml*) echivalentă cu *ml* de tiosulfat de sodiu 0,005 *n*

TABEL 14

CORESPONDENŢA ÎNTRE NUMĂRUL DE MILILITRI TIOSULFAT 0,005 *N* ŞI VALORILE GLICEMIEI.

ml $Na_2S_2O_3$	*0.00*	*0,01*	*0,02*	*0,03*	*0,04*	*0,05*	*0,06*	*0,07*	*0,08*	*0,09*
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,0	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	104	102	101	99	97	95	93	92	90
1,5	88	86	84	83	81	79	77	75	74	72
1,6	70	68	66	65	63	61	59	57	56	54
1,7	52	50	48	47	45	43	41	39	38	36
1,8	34	32	31	29	27	25	24	22	20	19
1,9	17	15	14	12	10	8	7	5	3	2

Se citeşte din tabel *mg* glucoză/100 *ml* corespunzătoare valorii de titrare. Dacă se folosesc 2 *ml* de soluţie de fericianură de potasiu 0,01 *n*, atunci se adaugă 385 *mg*/100 *ml*. Se scad *mg* de glucoză/*ml* corespunzătoare titrării probei blanc.

Ex. Dacă s-a titrat cu 0,7 *ml* $Na_2S_2O_3$ 0,005 *n* proba de sînge şi cu 1,9 *ml* $Na_2S_2O_3$ 0,005 *n* proba martor atunci obţinem:

la 0,7 *ml* corespund în tabel 232 *mg* glucoză

la 1,9 *ml* corespund în tabel 17 *mg* glucoză deci:

mg glucoză/100 *ml* = 215.

BIBLIOGRAFIE

Prunty, F, T. G., McSwiney, R. R., Hawkins, J. B., *A Laboratory Manual of Chemical Pathology*, Pergamon Press, London—New-York—Paris—Los Angeles, 1959, p. 208—211.

Scanned with OKEN Scanner

6.1.6. | INTERPRETAREA MODIFICĂRILOR PATOLOGICE ALE GLICEMIEI

Scăderea exprimată a glucozei sanguine (hipoglicemia) se constată de cele mai multe ori după administrarea unor doze excesive de insulină sau alte preparate hipoglicemiante (de ex. tolbutamid). Hipoglicemii se constată și în adenoame ale insulelor lui Langerhans (Insulinom) precum și insuficiențe hepatice grave, insuficiența hipofizară sau insuficiența suprarenală.

Hiperglicemia trecătoare se poate observa postprandial sau în legătură cu stări emoționale sau după administrarea de catecolamine.

Hiperglicemiile de durată sînt caracteristice pentru diabetul zaharat clinic manifest. În formele de diabet asimptomatic (chimic) glicemia à jeun este adeseori normală iar defectul metabolic se evidențiază prin probe de încărcare. Cea mai des utilizată probă de încărcare constă în administrarea pe cale orală a 50 g glucoză (sau 1 *g/kg* greutate corporală) dizolvată în 250 *ml* apă și urmărirea glicemiei din 30 în 30 de minute, pe timp de 2 ore sau 2 ore 1/2. La normali creșterea maximă a glicemiei după încărcare nu depășește 160 *mg*/100 *ml*, iar la două ore de la administrarea glucozei, glicemia trebuie să fie sub 120 *mg*/100 *ml*. Pentru detalii privind diversele teste de explorare dinamică a metabolismului glucidic recomandăm bibliografia:

Teodorescu Exarcu, I., *Explorarea paraclinică*, Ed. Medicală, București, 1970. Duncan, G. G., *Bolile metabolismului* (traducere din limba engleză), Editura medicală, București, 1966. Zilva, I. F., Pannall, P. R., *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment*. Ed. Lloyd-Luke, London, 1972.

6.2. | Dozarea galactozei

Principiu. Galactoza în prezența NAD-ului este oxidată, sub acțiunea enzimatică a galactozodehidrogenazei, la galactonolactonă și apariția simultană de NADH.

$$\text{Galactoză} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\textit{galactozo-DH}} \text{Galactono-lactonă} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Galactoza este dozată indirect prin măsurarea cantității de NADH rezultată în reacție, deoarece cantitatea de NADH formată este echivalentă cu cantitatea de galactoză din probă. Absorbția NADH se măsoară în U.V. la 366, 340 sau 334 *nm*.

Reactivi. 1) Tampon fosfat 0,2 *M*, *pH* 7,5 (preparare vezi anexă tampoane). 2) Soluție de NAD 13 *mM* (de notat că greutatea moleculară a NAD diferă în funcție de sursă). Soluția se păstrează maximum o săptămînă la +4°C. 3) Galactozo-dehidrogenază (5 *mg/ml*): 15 *mg*

Scanned with OKEN Scanner

galactozodehidrogenază, apă distilată pînă la 3 *ml* (se păstrează la +4° chiar și un an). 4) Acid percloric 0,33 *n*: 2,85 *ml* $HClO_4$ 70% (sau 3,6 *ml* $HClO_4$ 60%), apă bidistilată pînă la 100 *ml*.

Tehnica. Pentru determinări se folosește sînge venos proaspăt, recoltat cu ajutorul unei micropipete de 0,2 *ml*, gradată pînă la vîrf. Recoltarea se face din deget sau din lobul urechii.

Într-un tub de centrifugă de 10 *ml* se pipetează următoarele:

Acid percloric 0,33 *n* (*ml*)	1,0
Sînge (*ml*)	0,2

Se amestecă bine. Se lasă 5 minute în repaus după care se centrifughează 5—10 minute la 3000 r.p.m. Supernatantul se transvazează într-o sticluță curată și uscată cu dop. Această soluție poate fi păstrată la rece maximum 24 de ore.

Într-o cuvă de spectrofotometru din cuarț se pipetează următoarele:

Tampon fosfat 0,2 *M*, *pH* 7,5 (*ml*)	3,0
Soluție NAD 13 *mM* (*ml*)	0,1
Supernatant sînge (*ml*)	0,2

Se amestecă bine cu o baghetă mică din plastic sau sticlă. Se citește extincția E_1 la 366, 340 sau 334 *nm*, în cuvă de 1 *cm*, temperatura 20°—25°C.

Suspensie de galactozodehidrogenază (*ml*)	0,02

Se amestecă bine. Se lasă 30—40 minute în repaus pentru ca reacția să aibă loc, după care se citește din nou extincția E_2 în aceleași condiții. Diferența $E_2 - E_1 = \Delta E$.

Pentru fiecare schimbare a soluțiilor trebuie verificată extincția enzimei, față de apă distilată. Extincția obținută pentru apa distilată se adună la E_1 și numai după aceea se scade din E_2.

Deoarece în cursul determinărilor, sîngele suferă anumite diluții datorită reactivilor adăugați, se va calcula un factor de diluție. Știind că 1 *ml* de sînge cîntărește 1,06 *g* și că după deproteinizare aproximativ 80% din greutatea inițială trece în supernatant factorul de diluție se calculează astfel:

$$0{,}2 \times 1{,}06 \times 0{,}8 \approx 0{,}17 \text{ } ml \quad \text{de unde:}$$

$$F = \frac{\text{volumul acidului percloric + volum sînge corectat după deproteinizare}}{\text{volumul sîngelui luat în lucru}}$$

$$F = \frac{1 + 0{,}17}{0{,}2} = 5{,}85$$

Concentraţia de galactoză se calculează ţinînd seama de următoarele relaţii:

$\Delta E_{366\,nm} \times 529 = mg$ galactoză/100 *ml* sînge
$\Delta E_{340\,nm} \times 281 = mg$ galactoză/100 *ml* sînge
$\Delta E_{344\,nm} \times 291 = mg$ galactoză/100 *ml* sînge

Factorul *F* este inclus în cifra 529 cu care se înmulţeşte ΔE. Cifra 529 se obţine din relaţia:

$$\frac{1,2}{3,3 \times 0,2} \times 50 \times 5,85 = 529,425$$

unde 1,2 = volumul final la deproteinizare
0,2 = *ml* supernatant luat în lucru
3,3 = un factor reprezentînd coeficientul milimolar de extincţie (coeficientul milimolar de extincţie = reprezintă diferenţa de extincţie a 1 *ml* de soluţie ce conţine 1 *µmol* NAD sau NADH, citită în cuvă de 1 *cm*).
50 = pentru exprimarea la 100 *ml*
5,85 = factorul de diluţie.

Exemplu de calcul

Dacă s-a plecat de la 0,2 *ml* sînge proaspăt din care apoi s-au luat în lucru 0,2 *ml* supernatant (după tratarea cu $HClO_4$). Presupunînd că s-au citit la 366 *nm* următoarele extincţii:

Înainte de adăugarea galactozo-DH	$E_1 = 0,112$
30 de minute după adaus de galactozo-DH	$E_2 = 0,205$
Diferenţa de extincţii $E_2 - E_1$	$\Delta E = 0,093$

deci: $0,093 \cdot 529 = 49,2$ *mg* galactoză/100 *ml* sînge.

Valori normale: pînă la 4,3 *mg*/100 *ml*.

BIBLIOGRAFIE

Rommel, K., Klin. Wschr., *46*, (1968), 936. Tengström, B., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 18, suppl. 92, (1966), 132. Forsander, O. A., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 18, suppl. 92, (1966) 143.

6.3. | Dozarea fructozei

Principiu. Serul deproteinizat în prealabil, prin tratare cu sulfat de zinc în mediu puternic alcalin, se încălzeşte cu rezorcină în prezenţă de acid clorhidric concentrat. Apariţia unei colorаţii roşii indică

Scanned with OKEN Scanner

prezența fructozei (Reacția Seliwanoff). Cantitatea de fructoză prezentă este proporțională cu intensitatea colorației obținute.

Reactivi. *1*) Soluție de sulfat de zinc 10%: 10 *g* $ZnSO_4$ crist. apă pînă la 100 ml. *2*) Hidroxid de sodiu 0,5 *N*: 20 *g* NaOH pelete, apă distilată pînă la 1000 *ml*. *3*) Soluție de acid clorhidric 30%: 30 *ml* HCl conc., apă distilată pînă la 100 *ml*. *4*) Reactiv rezorcină tiouree: 0,1 *g* rezorcină, 0,25 *g* tiouree, acid acetic glacial pînă la 100 *ml*. Se prepară proaspătă. *5*) Standard de fructoză 20 *mg*/100 *ml*: 20 *mg* fructoză, apă pînă la 100 *ml*. Se prepară proaspătă.

Tehnica. *1*. Deproteinizarea: se amestecă într-un tub de centrifugă de 10 *ml*: 7,5 *ml* apă distilată, 0,5 *ml* ser sau alt lichid biologic, 1,0 *ml* soluție sulfat de zinc 10%, 1,0 *ml* soluție hidroxid de sodiu 0,5 *N*. Se acoperă și se agită din cînd în cînd într-un interval de 10 minute. Se centrifughează. Supernatantul se filtrează printr-o hîrtie nr. 41. Schleicher—Schull într-o eprubetă (în lipsa acestui tip de hîrtie de filtru, se va alege una cu pori cît mai fini). 2,0 *ml* din soluția astfel obținută se pipetează într-o eprubetă. Paralel în altă eprubetă se pipetează 0,2 *ml* apă pentru o probă în alb.

2. Standardul. În 3 eprubete se pipetează următoarele:

Reactivi	1	2	3
Soluție standard fructoză (*ml*)	0,5	1,0	2,0
apă distilată (*ml*)	1,5	1,0	0
Concentrație finală *mg*%	5	10	20

3. În toate 5 eprubetele (proba, proba în alb și cele 3 soluții standard), se pipetează 1 *ml* reactiv rezorcină-tiouree și 7 *ml* HCl 30%. Se agită bine și se acoperă ușor cu un dop de vată neabsorbantă.

4. Se încălzește pe baia de apă la 80°C timp de exact 10 minute. Eprubetele se răcesc la întuneric și după 30 de minute, densitatea optică se citește la 540 *nm* în cuvă de 1 *cm*.

Calcul. Se trasează o curbă de etalonare cu soluții standard care conțin 5, 10, 20 *mg* fructoză la 100 *ml*. Se citește concentrația probei necunoscute de fructoză de pe această curbă. Se înmulțește cu factorul diluției 20 și se obține astfel concentrația fructozei din probă în *mg*/100 *ml* ser.

Observații. În același mod se poate doza fructoza și din alte lichide biologice.

BIBLIOGRAFIE

Mann, T., Lancet, 1 (1948) 446 modificată. Prunty, F. T. G., McSwiney, R. R., Hawkins, J. B., *A Laboratory Manual of Chemical Pathology*, Pergamon Press, London—New-York—Paris—Los Angeles, 1959, 130—131.

Scanned with OKEN Scanner

6.4. | Dozarea inulinei şi fructozei

Inulina este utilizată pentru determinarea spaţiului extracelular şi pentru determinarea clearance-ului glomerular. Determinarea concentraţiei polifructozanului în plasmă nu a dat rezultate satisfăcătoare. Aceasta se datoreşte faptului că inulina este compusă din două fracţiuni dintre care una este stabilă şi cealaltă instabilă faţă de alcalii. Este posibil să se elimine acest inconvenient înlocuind inulina cu un alt polifructozan. Pentru determinarea inulinei (şi fructozei), se utilizează metoda cu rezorcină care este destul de specifică pentru fructoză, dar care dă rezultate puţin reproductibile. Rezultate mai bune se obţin cu difenilamina, dar aceste rezultate sînt mai puţin specifice pentru fructoză, şi în plus metoda este mai dificil de efectuat.

Metoda cu antronă prezintă avantajul de a fi mult mai simplă şi mai uşor de efectuat.

Principiu. Deproteinizare cu acid tricloracetic, adaus de reactiv antronă modificat şi incubare 50 de minute la 37°C. Se citeşte apoi la 630 *nm* extincţia complexului colorat care se formează.

Reactivi. 1) Acid tricloracetic 0,61 *M* (10%): 10 *g* acid tricloracetic, apă demineralizată pînă la 100 *ml*. Stabilitate nelimitată. *2*) Reactiv antronă: 130 *ml* apă demineralizată, 500 *ml* H_2SO_4 conc. (cu grijă!), 50 *mg* antronă (recristalizată de 2 ori din CH_3COOH glacial cald). Se solvă prin agitare puternică. Este stabilă timp de 2 luni la +4°C în fiole închise. O uşoară creştere a culorii galbene nu deranjează. *3*) Standard inulină, 5 *mg*/100 *ml:* 25 *mg* inulină comercială se dizolvă într-o soluţie de acid tricloracetic 0,61 *M*. Se completează la 500 *ml*. Stabilitatea soluţiei este nelimitată la temperatura ambiantă.

Tehnica. 1) Deproteinizare: 0,1 *ml* plasmă sau ser + 1,0 *ml* acid tricloracetic 0,61 *M*. Se lasă 5 minute în repaus şi apoi se centrifughează 10 minute la 3000 r.p.m.

$$\text{Diluţia} = \frac{VF}{VA} = \frac{1{,}1}{0{,}1} = 11$$

unde VF = volumul final
VA = volumul serului

2) În 3 eprubete se pipetează următoarele:

Reactivi	*P*	*M*	*S*
reactiv antronă (*ml*)	1,0	1,0	1,0
supernatant (*ml*)	0,1	—	—
ac. tricloracetic (*ml*)	—	0,1	—
standard 5 *mg*/100 *ml* (*ml*)	—	—	0,1

unde: P = proba, M = martor, S = standard.

Scanned with OKEN Scanner

Se acoperă cu un refrigerent de sticlă (refrigerent Ostrogovici) și se încălzește 50 minute pe baia de apă la 37°C. Se lasă apoi în repaus 15 minute la temperatura ambiantă, după care se citește extincția la 630 *nm* față de apă distilată. Coloraţia este stabilă timp de 3 ore.

$$Calcul.\ mg/100\ ml\ (\text{ser sau plasă}) = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot C_S \cdot \frac{VF}{VA}$$

$$mg/100\ ml = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot 5 \cdot \frac{1{,}1}{0{,}1}$$

$$mg/100\ ml = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot 55$$

unde: E_P = extincţie probă; E_S = extincţie standard; E_M = extincţie martor; C_S = concentraţie standard.

Specificitate. În condiţiile de mai sus, glucoza nu reacţionează aproape deloc. Deci reacţia este suficient de specifică pentru fructoză, respectiv inulină.

Observaţii

1. În momentul deproteinizării cu acid tricloracetic este necesară o bună amestecare a soluţiilor, deoarece există pericolul ca o parte din inulină să fie antrenată de proteine.

2. Metoda nu se poate folosi cînd glucoza sanguină depăşeşte 200 *mg*/100 *ml*.

3. Legea lui Lambert Beer este valabilă numai pentru concentraţii de inulină < 100 *mg*/100 *ml* în plasmă sau 5 *g*/100 *ml* în urină.

4. Pentru determinarea fructozei din plasmă sau urină, procedăm la fel, folosind însă un standard cu fructoză 5 *mg*/100 *ml*.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimié clinique théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

6.5. | Determinarea pentozelor (D-Xiloza)

Azi se foloseşte aproape exclusiv metoda Roe şi Rice cu parabromanilină.

Principiu. Supernatantul, obţinut în urma precipitării albuminelor, în prezenţa reactivului care conţine acid acetic glacial, tiouree şi parabromanilină, formează furfurol, prin deshidratarea pentozelor în timpul încălzirii la 70°C timp de 10 minute.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi. 1) Soluţie de acid acetic glacial, tiouree (soluţie saturată la rece de tiouree în acid acetic glacial), 4 *g* tiouree, acid acetic glacial pînă la 100 *ml.* 2) Reactiv parabromanilină: 2 *g* parabromanilină, soluţie acid acetic glacial-tiouree pînă la 10 *ml.* Se conservă în flacoane brune. În stare congelată se păstrează mai multe săptămîni. 3) Standard de xiloză (10 *mg*/100 *ml*) 10 *mg* D-xiloză, soluţie saturată la rece de acid benzoic pînă la 100 *ml*).

Tehnica. 0,1 *ml* (sînge integral, ser sau plasmă), 0,2 *ml* acid tricloracetic 10%. Se lasă 5 minute în repaus după care se centrifughează 10 minute la 3000 r.p.m.

În 3 eprubete se pipetează următoarele:

Reactivi	*Probă*	*Martor*	*Standard*
Reactiv p. bromanilină (*ml*)	1,0	1,0	1,0
Supernatant (*ml*)	0,1	—	—
Ac. tricloracetic (*ml*)	—	0,1	—
Standard xiloză (*ml*)	—	—	0,1

Se încălzeşte pe baia de apă timp de 10 minute la 70°C. Se lasă în repaus la întuneric timp de 60—120 de minute. La 3 ore după încălzire se citeşte extincţia la 546 *nm* faţă de apă.

Calcul.

$$mg/100\ ml = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot C_S \cdot \frac{VF}{VA} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot 10 \cdot \frac{0,3}{0,1}$$

$$mg/100\ ml = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot 30$$

Specificitate. Metoda este specifică pentru pentoze: D-xiloză, D-arabinoză, D-riboză etc. Glucoza şi galactoza interferează numai dacă concentraţia lor depăşeşte 2 *g*/100 *ml.*

Observaţie. Lichidul cefalorahidian se lucrează exact în aceleaşi condiţii.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimié clinique théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

6.6. | Dozarea hexozaminelor (Glucozamina)

Principiu. 1. Hexozaminele din plasmă sînt legate de proteine, astfel încît pentru a le elibera este necesară o prealabilă hidroliză. Acest lucru se realizează prin încălzire cu acid clorhidric. Proteinele care precipită sînt apoi îndepărtate prin filtrare.

Scanned with OKEN Scanner

2. Prin încălzire cu metil-etil-cetonă în mediu alcalin, hexozaminele se transformă în monopiroli, care, prin tratare cu reactiv Erlich, dezvoltă o culoare roşie stabilă. Culoarea se compară cu cea obţinută prin acelaşi procedeu, folosind o soluţie standard de hexozamină.

Reactivi. *1*) Soluţie de clorură de sodiu 0,9%. *2*) Soluţie de acid clorhidric *n*: 83 *ml* HCl concentrat, apă distilată pînă la 1000 *ml*. *3*) Soluţie de hidroxid de sodiu 0,5 *n*: 20 *g* NaOH pelete, apă distilată pînă la 1000 *ml*; *4*) Soluţie de carbonat de sodiu 0,5 *n*: 26, 5 Na_2CO_3 cristale, apă distilată pînă la 1000 *ml*. *5*) Soluţie de metil-etil-cetonă: 1 *ml* metil-etil-cetonă $CH_3—CO—CH_2CH_3$, 50 *ml* soluţie de Na_2CO_3 0,5 *n*. Se agită bine pînă se amestecă şi se păstrează la +4°C. Se prepară proaspătă tot la 4—5 zile. *6*) Reactiv Erlich: 0,8 *g* paradimetilaminobenzaldehidă (recristalizată de 2 ori din alcool diluat, 30 *ml* etanol (alcool etilic), 39 *ml* HCl concentrat. Reactivul are o stabilitate nelimitată. *7*) Hexozamină hidroclorică standard. a) Soluţie standard de 1 *mg/ml:* 25 *mg* glucozamină hidroclorică, apă distilată pînă la 25 *ml*. Se păstrează la +4°C. b) Soluţie standard 10 µg/*ml:* 1 *ml* soluţie standard (1 *mg/ml*), apă distilată pînă la 100 *ml*. *8*) Alcool etilic (liber de aldehidă).

Tehnica. Hidroliza. *a*) 1 *ml* ser (sau plasmă) se diluează cu 9 *ml* soluţie de NaCl 0,9%. Într-o eprubetă gradată de 5 *ml* prevăzută cu un dop de sticlă pentru a evita evaporarea, se pipetează 1,0 *ml* ser diluat şi 2,0 *ml* HCl *n*. Se încălzeşte timp de 5 ore într-o baie de apă care fierbe. Se execută un martor în aceleaşi condiţii folosind în loc de ser, apă. *b*) Tuburile se răcesc. Se completează cu apă distilată pînă la 5,0 *ml*. Se agită bine. Se filtrează bine hidrolizatul printr-o hîrtie Whatman nr. 1, cît mai mică sau se centrifughează. Se pipetează 0,5 *ml* filtrat (sau supernatant) respectiv 0,5 *ml* soluţie martor, în eprubete gradate de 10 *ml* prevăzute cu dop şi se neutralizează cu NaOH 0,5 *n*. Pentru a putea determina cu precizie cantitatea de NaOH 0,5 *n* care este necesară neutralizării probei, se efectuează separat o titrare a unui volum de 0,5 *ml* filtrat în prezenţa de fenolftaleină.

2) *Reacţia de culoare.* *a*) Într-o eprubetă gradată de 10 *ml*, prevăzută cu un dop, se pipetează 1,0 *ml* soluţie standard (10 µg/*ml*) de hexozamină. Se adaugă 1 *ml* reactiv metil-etil-cetonă, în cele 3 probe: martor, standard şi ser hidrolizat neutralizat. Se acoperă probele şi se încălzesc în baia de apă care fierbe, timp de 25 minute. Partea superioară a eprubetei trebuie să fie scoasă în afară din apă pentru a minimaliza pierderea prin evaporare a metil-etil-cetonei. Acest lucru se mai poate realiza foarte bine prin folosirea de refrigerente de dimensiuni foarte mici (nefrigerent Ostrogowich).

b) Eprubetele se răcesc şi se adaugă apoi 6 *ml* alcool etilic. În timpul adausului de etanol se formează frecvent un precipitat, care

însă se redisolvă în momentul adăugării reactivului Erlich. Se adaugă 1 *ml* reactiv Erlich și se adaugă alcool etilic pînă la 10 *ml*. Se agită bine (însă cu grijă) pentru a se amesteca conținutul. Se introduc apoi eprubetele neacoperite într-o baie de apă la 70°C timp de 10 minute pentru a accelera eliberarea de bioxid de carbon. Eprubetele se lasă apoi să stea la temperatura camerei timp de 20—30 minute și se ajustează la 10 *ml* cu etanol, dacă este necesar. Se citește extincția probei (E_P) și a standardului (E_S) față de martor la 520 *nm* în cuve de 2 *cm*.

Calcul. Hexozamine în 0,5 *ml* hidrolizat $= \frac{E_P}{E_S} \times 10$ *μg*

Diluția serului este 1 : 50.

Concentrația de hexozamine în ser $= 10 \times 50 \times 2$ *μg/ml*.

Deci hexozamine *mg%* ser $= \frac{E_P}{E_S} \times \frac{10 \times 50}{1000} \times 100 \times 2$

hexozamine *mg%* ser $= \frac{E_P}{E_S} \times 100$

BIBLIOGRAFIE

Elson, A. L., Morgan, W. T. J., Biochem. J., 27 (1933) 1824. Palmer, J. W., Smyth, E. M., Meyer, K., J. Biol. Chem., 119 (1937) 491. West, R., Clarke, D. H., J. Chim. Invest., 17 (1938) 173. Prunty, F. T. G., McSwiney, R. R., Hawkins, J. B., *A Laboratory Manual of Chemical Pathology*, Pergamon Press., London—New York—Paris, Los Angeles (1959) p. 150—152.

6.7. | Determinarea acidului lactic.

Acidul lactic rezultat din procesul de glicoliză anaerobă poate fi dozat enzimatic, colorimetric sau prin cromatografie pe acid silicic. Vom descrie doar metoda enzimatică și cea colorimetrică.

6.7.1. Metoda enzimatică

Principiu. Se folosește sistemul lactat dehidrogenazei (LDH). Echilibrul reacției este defavorabil determinării lactatului de aceea, piruvatul și H^+ trebuie captați în afara sistemului (piruvatul prin transformare în hidrazonă și H^+ prin captare într-un tampon puternic (alcalin).

L (+) lactat
NAD^+
Hidrazină
Piruvat

$\xrightarrow[pH\ 9,5]{LDH}$

Hidrazona piruvatului
$NADH + H^+$
H_2O

Creşterea extincţiei la 366 *nm* este direct proporţională cu concentraţia lactatului.

Reactivi: *1*) Soluţie de acid percloric 0,66 *n*: 5,7 *ml* $HClO_4$ (70%), apă demineralizată pînă la 100 *ml*. Stabilitate nelimitată. *2*) Soluţie de carbonat de potasiu 5 *M*: 69 *g* K_2CO_3 anh, apă demineralizată pînă la 100 *ml*. Stabilitate nelimitată. *3*) Tampon glicocol-hidrazină: 7,5 *g* glicocol, 5,2 *g* sulfat de hidrazină, 0,2 *g* EDTA sare sodică. $2H_2O$, 20 *ml* apă demineralizată, 51 *ml* NaOH 2 *N*, apă demineralizată pînă la 100 *ml*. *4*) Soluţie de NAD, 30 *mM* (20 *mg* NAD, 1 *ml* apă demineralizată. *5*) Lactat dehidrogenază 0,5 *mg/ml*. *6*) NaOH 2 *n*: 80 *g* NaOH pelete, apă distilată pînă la 1000 *ml*.

Prelevarea sîngelui. Raportul piruvat/lactat se schimbă cîteva secunde după prelevarea sîngelui. De aceea rezultatele cele mai exacte se obţin dacă prelevarea sîngelui se face direct în acid percloric răcit la zero grade. În acest scop pregătim eprubetele cu 6,0 *ml* acid percloric şi le cîntărim (G_1). Se amestecă bine cu 2 *ml* sînge integral pe care-l lăsăm să curgă în acidul percloric. Cîntărim tuburile a doua oară (G_2).

Eliminarea materiilor albuminoide: se centrifughează 10 minute la 3000 r.p.m. Se pipetează 4 *ml* lichid supernatant şi se adaugă 0,2 *ml* soluţie K_2CO_3. Se amestecă bine. *pH*-ul este cuprins între 7 şi 8. Se centrifughează din nou 10 minute, la 3000 r.p.m. Lichidul supernatant este utilizat pentru determinarea piruvatului şi lactatului.

Tehnica

Se pipetează în eprubete	*Probă*	*Martor*
Tampon glicocol-hidrazină (*ml*)	0,5	0,5
Soluţie de NAD (*ml*)	0,1	0,1
Apă demineralizată	—	0,05
Lichid supernatant (*ml*)	0,05	—
Soluţie de lactat dehidrogenază (*ml*)	0,1	0,1

Eprubetele se introduc într-o baie de apă la 25°C timp de 30 de minute. Extincţia probei şi a martorului se citesc faţă de apă demineralizată la 366 *nm* sau 340 *nm*.

Calcul. *a*) Factorul de corecţie pentru eliminarea materilor albuminoide:

$$k = \frac{6{,}0 + (G_2 - G_1)}{G_2 - G_1} \cdot \frac{4{,}2}{4{,}0} = \frac{6{,}0 + (G_2 - G_1)}{G_2 - G_1} \cdot 1{,}05$$

b) Factorul de corecţie pentru repartiţia în apă a sîngelui: cum metaboliţii sînt repartizaţi numai în apa conţinută în sînge, razultatul trebuie multiplicat cu un factor 1,25 pentru a obţine o aproximaţie a concentraţiei apei sanguine.

Scanned with OKEN Scanner

c) Calculul schimbării extincţiei:

$$\Delta E = E_P - E_M$$

unde E_P = extincţia probă

E_M = extincţie martor.

d) Calculul concentraţiei, $\lambda = 366\ nm$ ($\varepsilon = 3300$).

$$\mu Moli\ \text{litru}^{-1} = \frac{\Delta E}{\varepsilon \times d} \cdot \frac{VF}{VA} \cdot 10^6 \cdot 1{,}25\ k$$

unde VF = volumul final
VA = volumul probei
d = 1 cm

$$\mu Moli\ \text{litru}^{-1} = \frac{E_P - E_M}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}75}{0{,}05} \cdot 10^6 \cdot 1{,}25 \cdot k$$

$$\mu Moli\ litru^{-1} = E_P - E_M \cdot 5{,}68 \cdot 10^3 \cdot k$$

$$m\ Moli\ \text{litru}^{-1} = E_P - E_M \cdot 5{,}96 \cdot \frac{6{,}0 + (G_2 - G_1)}{G_2 - G_1}$$

e) Calculul concentraţiei: $\lambda = 340\ nm$ ($\varepsilon = 6200$)

$$m\ Moli\ \text{litru}^{-1} = E_P - E_M \cdot 3{,}17 \cdot \frac{6{,}0 + (G_2 - G_1)}{G_2 - G_1}$$

Specificitate. Metoda enzimatică este foarte specifică pentru L(+) lactat. Lactat dehidrogenaza nu reduce D(—) lactatul.

Valori normale: 0,9—1,2 *mMoli*/litru (*mEq/l*) respectiv 9—12 *mg*/100 *ml*. Dacă subiectul a păstrat repaus la pat cu 1—2 ore înainte de recoltare, iar sîngele a fost trecut direct în acid percloric răcit valorile normale sînt de 0,6—0,7 *mEq/l* (6—7 *mg*/100 *ml*).

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimié clinique théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

6.7.2. | METODA COLORIMETRICĂ

Principiu. Prin încălzire limitată cu acid sulfuric, acidul lactic se transformă în acetaldehidă care în prezenţa ionilor de cupru formează împreună cu parahidroxidifenilul un complex colorat a cărui extincţie se măsoară la 560 *nm*.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi. *1*) Acid tricloracetic 10%. *2*) Soluţie sulfat de cupru 20%. Se dizolvă 20 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ în apă distilată şi se aduce volumul la 100 *ml*. *3*) Soluţie sulfat de cupru 4%. Se diluează 1 volum din soluţia precedentă cu 4 volume apă distilată. *4*) Oxid de calciu (var nestins). *5*) Acid sulfuric p.a. *6*) Soluţie parahidroxidifenil. Se amestecă 12,5 *ml* NaOH 1 *N* cu 20 *ml* apă distilată. Se dizolvă în acest amestec 1,5 g parahidroxidifenil, se răceşte şi se completează volumul la 100 *ml* cu apă distilată. Se păstrează la +4°C. *7*) Soluţie NaOH 1 *N*. *8*) Soluţie standard de acid lactic 100 *mg*/100 *ml*. (Se poate prepara prin dizolvarea a 106,7 *mg* lactat de litiu în 100 *ml* apă distilată). Înainte de fiecare dozare se vor realiza trei diluţii conţinînd acid lactic în proporţie de 10 *mg*%, 25 *mg*% şi 50 *mg*%.

Tehnica. 0,5 *ml* sînge se amestecă imediat după recoltare cu 0,5 *ml* acid tricloracetic 10%. În paralel se pregăteşte o probă în alb (0,5 *ml* apă distilată + 0,5 *ml* acid tricloracetic) şi trei probe standard (cîte 0,5 *ml* din fiecare diluţie + 0,5 *ml* acid tricloracetic). Se agită bine şi se lasă în contact timp de 30 minute după care se centrifughează. Fără a se decanta supernatantul şi fără a se aduce în suspensie precipitatul se adaugă în fiecare eprubetă 0,25 *ml* sulfat de cupru 20%, 1,2 *ml* apă distilată şi 0,2 g oxid de calciu. Se agită supernatantul, lăsînd în contact amestecul timp de 20 minute. Se trece în suspensie precipitatul şi după 20 minute se centrifughează timp de 15 minute la 3600 rotaţii pe minut.

Se iau apoi cîte 1 *ml* din fiecare eprubetă şi se trec în în alt şir de eprubete la care se adaugă în continuare 0,05 *ml* $CuSO_4$ 4% şi 6 picături H_2SO_4 concentrat. Se agită 30 secunde. Se scufundă într-o baie de apă la fierbere pe timp limitat de numai 4 minute. Se opreşte reacţia cufundînd eprubetele într-o baie de apă cu gheaţă. După răcire se adaugă în fiecare eprubetă 0,1 *ml* reactiv parahidroxidifenil. Se agită, se lasă 30 minute la temperatura camerei, se cufundă apoi timp de 60 secunde într-o baie la fierbere şi se răcesc la jet de apă. Se citesc extincţiile la 560 *nm* faţă de proba în alb iar rezultatul se obţine din curba de calibrare.

Valori normale: 10—15 *mg*/100 *ml* (sau 1—1,5 *mEq*/l)

BIBLIOGRAFIE

Barker, S. B., Summerson, W. H., J. Biol. Chem., 138 (1941), 535. Devaux, G., *Choix de techniques de biochimie clinique*, Ed. Gauthier Villars, Paris, 1970.

Scanned with OKEN Scanner

6.8. | Determinarea acidului piruvic

Acidul piruvic poate fi determinat enzimatic sau colorimetric. Metodele colorimetrice sînt în acest caz puţine şi dau doar o orientare aproximativă asupra nivelului piruvicemiei.

6.8.1. | METODA ENZIMATICĂ

Principiu.. Determinarea se face prin intermediul sistemului lactatdehidrogenazei:

$$\text{L (+) lactat} + \text{NAD}^+ \underset{pH\ 7{,}5}{\overset{\text{LDH}}{\rightleftarrows}} \text{Piruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Întrucît echilibrul acestei reacţii are tendinţe de deplasare spre stînga scăderea densităţii optice la 366 *nm* este proporţională cu concentraţia acidului piruvic.

Reactivi. 1) Soluţie de acid percloric 0,66 *n* (6,6 *g*/100 *ml*): 5,7 *ml* $HClO_4$ (70%), apă demineralizată pînă la 100 *ml*. Stabilitate nelimitată. *2*) Soluţie de carbonat de potasiu 5 *M*: 69 *g* K_2CO_3 anh., apă demineralizată pînă la 100 *ml*. Stabilitate nelimitată. *3*) Tampon trietanolamină-EDTA *pH* 7,5 (vezi capitolul "*Tampoane*"). *4*) NaOH soluţie 0,01 *n*: 0,4 *g* NaOH pelete, apă demineralizată pînă la 1000 *ml*. *5*) Soluţie de NADH 3 *mM*: 2,1 *mg* NADH, 1 *ml* apă demineralizată. *6*) Soluţie de lactatdehidrogenază 0,5 *mg*/*ml*. *7*) Soluţii pentru reacţie. Piruvat I: se amestecă 1 parte soluţie de NADH cu 2 părţi soluţie tampon trietalonamină EDTA. Se prepară extemporaneu zilnic. Piruvat II: se amestecă 2 părţi lactatdehidrogenază cu 18 părţi soluţie tampon trietanolamină EDTA. Se prepară extemporaneu.

Prelevarea sîngelui (vezi determinarea acidului lactic).

Eliminarea materiilor albuminoide (vezi determinarea acidului lactic).

Tehnica. Se pipetează direct în cuva de la fotometru:

Lichid supernatant	0,5 *ml*
Piruvat I	0,1 *ml*

Se măsoară extincţia la 366 *nm* sau 340 *nm*. Se notează cu E_o. În continuare se adaugă Piruvat II 0,1 *ml*.

Se citesc extincţiile la intervale de 2 minute pînă se obţine o valoare constantă, pe care o notăm cu E_t.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul. *a*) Factorul de corecţie pentru eliminarea materiilor albuminoide:

$$k = \frac{6{,}0 + (G_2 - G_1)}{G_2 - G_1} \cdot \frac{4{,}2}{4{,}0} = \frac{6{,}0 + (G_2 - G_1)}{G_2 - G_1} \cdot 1{,}05$$

b) Factor de corecţie pentru proporţia apei din sînge:

Cum toţi metaboliţii sînt repartizaţi numai în apa din sînge, rezultatul trebuie multiplicat cu factorul 1,25 pentru a obţine o aproximaţie a concentraţiei apei sanguine.

c) Calculul schimbării de extincţie.

Schimbarea de extincţie ΔE comportă $\left[(E_0 - E_t) - \frac{E_0}{7}\right]$, $E_0/7$ trebuie retranşat pentru a corecta diluţia după adiţia soluţiei de tampon lactatdehidrogenază.

d) *Calculul concentraţiei:*

$$\lambda = 366\ nm\ (\varepsilon\ 3300)$$

$$\mu\ Moli\ \text{litru}^{-1} = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{VF}{VA} \cdot 10^6 \cdot 1{,}25 \cdot k$$

$$\mu\ Moli\ \text{litru}^{-1} = \frac{\Delta E}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}7}{0{,}5} \cdot 10^6 \cdot 1{,}25 \cdot k$$

$$\mu\ Moli\ \text{litru}^{-1} = \Delta E \cdot 0{,}534 \cdot 10^3 \cdot k$$

$$m\ Moli\ \text{litru}^{-1} = \left[(E_0 - E_t) - \frac{E_0}{7}\right] \cdot 0{,}561 \cdot \frac{6{,}0 + (G_2 - G_1)}{G_2 - G_1}$$

e) *Calculul concentraţiei :*

$$\lambda = 340\ mn\ (\varepsilon = 6200)$$

$$m\ Moli\ \text{litru}^{-1} = \left[(E_0 - E_t) - \frac{E_0}{7}\right] \cdot 0{,}298 \cdot \frac{6{,}0 + (G_2 - G_1)}{G_2 - G_1}$$

Valori normale. Pentru a obţine rezultate exacte în cazul lactatului şi piruvatului este necesar un repaus corporal de 1—2 ore şi prelevarea să se facă direct în acid percloric.

Pentru sînge venos

Lactat (*m Moli*/1000 *ml*) = 0,643 ± 0,079 (respectiv 6—7 *mg*/100 *ml*)
Piruvat (*m Moli*/1000 *ml*) = 0,146 ± 0,026 (sau 0,9 — 1,2 *mg*/100 *ml*).

Scanned with OKEN Scanner

Richterich, R., *Chimie clinique théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

6.8.2. DETERMINAREA COLORIMETRICĂ

Principiu. Sîngele deproteinizat este tratat cu 2—4 dinitrofenilhidrazină. Acidul piruvic prezent este astfel transformat în hidrazona sa. 2—4 dinitrofenilhidrazona este extrasă cu acetat de etil. O nouă extracție în mediu alcalin are ca scop îndepărtarea excesului de 2—4 dinitrofenilhidrazină. Densitatea optică a extractului alcalin se citește la 440 *nm*.

Reactivi. 1) Acid tricloracetic soluție 10%: 10 *g* $Cl_3C—COOH$ apă distilată pînă la 100 *ml*. Se păstrează în frigider. *2*) Soluție de 2—4 dinitrofenilhidrazină: 100 *mg* 2—4 dinitrofenilhidrazină, 100 *ml* acid clorhidric 2 *N*. Se filtrează și se păstrează în frigider în sticlă brună cel mult o lună. *3*) Acetat de etil. *4*) Soluție de carbonat de sodiu 20%: 20 g Na_2CO_3, apă distilată pînă la 100 *ml*. Se filtrează și se păstrează în sticle de polietilenă. *5*) Soluție de hidroxid de sodiu 2 *n*: 80 g NaOH pelete, apă distilată pînă la 1000 *ml*. *6*) Soluție de acid sulfuric 0,1 *n*: 25 *ml* H_2SO_4 1 *n*, apă distilată pînă la 250 *ml*. *7*) Soluție standard de acid piruvic comercial recristalizat de două ori. *a*) Soluție (1000 μg/*ml*): 50 *mg* acid piruvic, acid sulfuric 0,1 *n* pînă la 50 *ml*. Se prepară proaspătă. *b*) Soluție (20 μg/*ml*): 1,0 *ml* soluție de acid piruvic, acid sulfuric 0,1 *n* pînă la 50 *ml*. Se prepară extemporaneu.

Tehnica. 1. a) Sîngele se deproteinizează, pipetînd 3,0 *ml* de sînge imediat după recoltare, în 6 *ml* acid tricloracetic 10%. (Se recomandă recoltarea sîngelui fără stază produsă prin garou). Se agită bine și se centrifughează. Supernatantul se decantează.

b) Se prepară 4 standarde după cum urmează:

reactivi	*Proba în alb*	S_1	S_2	S_3	S_4
ac. tricloracetic 10% (*ml*)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
ac. piruvic (20 μg/*ml*) (*ml*)	0,0	0,5	1,0	2,0	3,0
ac. sulfuric 0,1*N* (*ml*)	3,0	2,5	2,0	1,0	0,0
piruvat μg/în 3 *ml*	0	3,3	6,7	13,3	20

2. În 12 eprubete sau tuburi cu dop avînd o capacitate de 15 *ml* se pipetează cîte 2 probe paralele după cum urmează:

Reactivi	*Probă în alb*		S_1		S_2		S_3		S_4		*Sînge*	
Soluţie blanc (*ml*)	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Standard 1 (*ml*)	—	—	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—
Standard 2 (*ml*)	—	—	—	—	3	3	—	—	—	—	—	—
Standard 3 (*ml*)	—	—	—	—	—	—	3	3	—	—	—	—
Standard 4 (*ml*)	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3		—
Filtrat sînge (*ml*)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3
2-4-dinitrofenildhidrazină (*ml*)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

2—4 dinitrofenilhidrazină se adaugă la intervale de 2 minute şi fiecare tub este lăsat să stea în repaus exact 10 minute. Cei 3 *ml* de filtrat de sînge corespund la 1 *ml* sînge iniţial.

3. Fiecărui tub i se adaugă 8 *ml* acetat de etil şi se scutură bine pentru a extrage fenilhidrazina acidului piruvic. Se aspiră stratul apos inferior şi se îndepărtează.

4. Extractelor de acetat de etil li se adaugă cîte 6,0 *ml* soluţie de carbonat de sodiu. Se agită bine timp de 2 minute pentru a extrage hidrazona în faza alcalină. Se aspiră faza superioară de acetat de etil.

5. Se pipetează cîte 5,0 *ml* de extract alcalin de carbonat de sodiu într-o eprubetă introdusă într-o baie de apă la fierbere şi se adaugă în fiecare cîte 5,0 *ml* de NaOH 2 *n*. Se lasă să stea 5—10 minute, după care se citeşte densitatea optică la un spectrofotometru la 440 *nm* în cuva de 2 *cm*.

Calcul. Se trasează o curbă de etalonare cu extincţiile obţinute pentru soluţiile standard. Se citeşte pe curbă µg acid piruvic conţinut în proba de sînge. Notînd cu N valoarea obţinută de pe curbă:

$$mg \text{ acid piruvic/100 } ml \text{ sînge} = \frac{N}{10}$$

Observaţii. Valorile obţinute cu această metodă sînt de 0,8—1,2 *mg*/100 *ml*, comparabile cu cele obţinute prin metoda enzimatică, dar acurateţea şi specificitatea metodelor colorimetrice lasă de dorit.

Creşterea piruvicemiei peste 1,3 *mg*/100 *ml* se întîlneşte în deficitul de vitamină B_1 şi în alcoolism. Pentru depistarea deficitelor de metabolizare a acidului piruvic se recomandă dozarea piruvicemiei după încărcarea cu glucoză (50 g pe cale orală). Pentru interpretarea probelor de hiperpiruvicemie provocată prin administrarea de glucoză recomandăm articolul lui Endtz şi Schuller).

Creşterea acidului acetilacetic în sînge poate cauza false creşteri ale valorilor piruvicemiei. Pentru îndepărtarea acetil acetatului se recomandă ca înaintea dozării acidului piruvic, filtratul deproteinizat

Scanned with OKEN Scanner

să fie încălzit pe baie de apă la fierbere pe timp de o oră în mediu acid. În acest scop 3 *ml* sînge proaspăt recoltat se amestecă cu 21 *ml* apă distilată și 3 *ml* wolframat de sodiu 10%, adăugîndu-se imediat 3 *ml* H_2SO_4 2/3 *N*. La 10 *ml* din filtrat se adaugă 0,5 *ml* HCl concentrat, se acoperă eprubetele și se fierb timp de 50 *min*. După răcire se neutralizează la *pH* 7 cu hidroxid de sodiu concentrat, se aduce volumul la 10 *ml* se adaugă 1 *ml* reactiv fenilhidrazină, procedîndu-se în continuare așa cum s-a arătat mai sus. La calcul se va ține cont de diluție.

BIBLIOGRAFIE

King, E. J., Wotton, J. D. P., *Micro Analysis in Medical Biochemistry*, J. A. Churchill Ltd., London, 1956, p. 217. Friedmann, T. E., Hangen, G. E., J. Biol. Chem., 147 (1943), 415. Endtz, L. I., Schuller, E., Presse Medicale, 68 (1960), p. 1933.

7. SUBSTANȚELE MINERALE DIN PLASMĂ

7.1. Dozarea electroliților

În această categorie se cuprind anionii și cationii menționați în tabelul 15.

TABEL 15

DATE PRIVIND PRINCIPALII ELECTROLIȚI AI PLASMEI

Electrolitul	*Greutate atomică (moleculară)*	*Valența*	*Greutatea echivalentului*	*Factor pentru transformare din mg % în mEq/l*
Cationi :				
sodiu (Na^+)	23	1	23	0,435
potasiu (K^+)	39	1	39	0,256
calciu (Ca^{2+})	40	2	20	0,500
magneziu (Mg^{2+})	24	2	12	0,833
Anioni :				
bicarbonat (CO_2)				0,446
clorură (Cl^-)	35,5	1	35,5	0,282
(NaCl)	58,5	1	58,5	0,171
fosfat anorganic (P)	31	1,8	17,2	0,580
sulfat anorganic (S)	32	2	16	0,625
proteinat				2,43

Scanned with OKEN Scanner

Este recomandabil ca exprimarea concentrației electroliților să se facă în *mEq*/litru. Avantajul acestei exprimări reiese din exemplul următor: dacă în plasmă concentrația clorului este 360 *mg*%, iar a Na 325 *mg*%, s-ar părea că concentrația clorului este mai ridicată decît a Na. Dar exprimată în *mEq* vom avea 142 pentru sodiu și 100 pentru clor, deci clorul este echivalent doar cu 2/3 din sodiul plasmatic.

De notat că fracțiunea ionizată a calciului poate fi măsurată doar aproximativ în condițiile laboratorului clinic. În cazul magneziului gradul de ionizare este în funcție de concentrația proteinelor și de *pH*, iar pentru fosforul anorganic raportul $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ este dependent de *pH*. În cazul proteinelor nu se cunoaște precis gradul de ionizare. Din acest motiv, exprimarea sub formă de *mEq/l* nu este întotdeauna indicată.

Conversia din *mg*% în *mEq*/litru se poate calcula folosind formula:

$$mEq/1 \text{ (sau } mVal/1) = \frac{mg/100\ ml \cdot 10 \cdot \text{valența}}{\text{greutate atomică}}$$

Folosind această formulă s-au calculat factorii de conversiune din tabelul 15. Pentru mai mare ușurință redăm într-un tabel la anexe conversiunea din *mg*% în *mEq*/litru pentru mai multe concentrații de electroliți serici.

7.1.1. SODIUL ȘI POTASIUL

Pentru dozarea acestor două elemente se folosește astăzi fotometria de flacără, metodă fizică foarte rapidă, care nu necesită decît cantități foarte mici de sînge. Metodele chimice mai vechi sînt foarte laborioase, necesită cantități importante de sînge și de aceea sînt astăzi abandonate.

Principiu. Proba se introduce în flacără și pentru o temperatură constantă a flacării în anumite condiții, intensitatea radiației emise este proporțională cu concentrația metalului în soluție. Se determină intensitatea unei linii emise, selecționate cu ajutorul unor filtre (de interferență, specifice fiecărui metal).

Aparatură: fotometrul cu flacără, vase din material plastic pentru păstrarea soluțiilor etalon și efectuarea diluțiilor, pipete, baloane cotate sau biurete.

Reactivi. Ca regulă generală, toți reactivii vor fi păstrați în flacoane de polietilenă și nu în vase de sticlă, fiindcă silicații din sticlă cedează mai mult sau mai puțin ionii de Na și K în soluție. La prepararea soluțiilor etalon se va folosi apă bidistilată sau tridistilată.

Scanned with OKEN Scanner

Soluţiile etalon se prepară din NaCl şi KCl uscate în prealabil timp de 24 ore la 110°C într-o etuvă şi lăsate să se răcească într-un exicator.

1. Soluţie etalon NaCl: 7,35 *g* NaCl, 5 *ml* formaldehidă 40% şi apă bidistilată ad 1000 *ml*. Soluţia conţine 3 *mg* Na/*ml* şi se diluează 1/500 la folosire.

2. Soluţie etalon KCl: 1,91 *g* KCl, 5 *ml* formaldehidă 40 % şi apă bidistilată ad 1000 *ml*. Soluţia conţine 1 *mg* K/*ml* şi se diluează 1/100 în momentul folosirii.

Se mai pot prepara soluţiile etalon şi în felul următor:

a) Soluţie etalon NaCl 100 *mEq*/litru: se cîntăresc 5,8455 *g* NaCl, se transferă într-un balon de 1000 *ml* şi se adaugă apă pînă la semn.

b) Soluţie etalon KCl 5 *mEq*/litru: se cîntăresc 0,3729 *g* KCl, se transferă în balon de 1000 *ml* şi se completează cu apă.

În sfîrşit, după o altă reţetă se prepară soluţiile etalon în felul următor:

Soluţie etalon de Na 1 *mg*/*ml*: 2,543 *g* NaCl şi apă bidistilată pînă la 1000 *ml*. La utilizare se diluează 1/50 cu apă bidistilată.

Soluţie etalon de K 0,5 *mg*/*ml* (care conţine şi 3 *mg* Na/*ml*): 0,955 g KCl, 7,630 g NaCl şi apă distilată ad 1000 *ml*. La întrebuinţare se diluează 1/100. Adăugarea Na la soluţia etalon de K este necesară deoarece prezenţa sa în ser provoacă o eroare în exces în aprecierea radiaţiei emise de K. Adăugînd la etalon o cantitate de Na apropiată de cea care se găseşte în ser se poate reduce sursa de eroare.

Tehnica. 1. Dozarea se poate face pe ser sau pe plasmă. În primul caz decolarea cheagului înainte de centrifugare produce o uşoară hemoliză, ceea ce introduce o eroare importantă, avînd în vedere că hematiile conţin de 20 de ori mai mult K decît plasma. Dacă se lucrează pe plasmă, sîngele se va recolta pe un anticoagulant lipsit de Na şi K (heparinat de Li şi de amoniu) şi se vor separa hematiile în prima oră după recoltare, altfel se obţin valori fals crescute pentru K. Practic se recoltează 5 *ml* sînge pe cîteva picături de heparinat de litiu, eventual direct într-un tub de centrifugă.

2. Diluţiile serului sau ale plasmei variază în funcţie de aparat. Pentru fotometrul Zeiss-Jena se face o diluţie 1/100 la dozarea K şi 1/500 pentru dozarea Na. Pentru fotometrul Jouan se poate face o diluţie 1/200 pentru Na şi 1/100 pentru K. Diluţiile se aleg în funcţie de curba de etalonare utilizată (făcută cu soluţiile etalon). Se recomandă ca diluţiile să se facă cu foarte mare grijă, iar pentru măsurarea apei bidistilată se recomandă folosirea unei biurete, în acest caz eroarea de măsurare a volumului fiind constantă.

Scanned with OKEN Scanner

Practic, se poate proceda în felul următor: se pipetează 0,1 *ml* ser (cu o pipetă de 1 *ml*) într-un flacon de material plastic (ambalaj de medicamente) și se adaugă 9,9 *ml* apă bidistilată dintr-o biuretă de 10 *ml*. Se agită bine. Se ia 1 *ml* din această diluție (1/100), se introduce în alt flacon și se adaugă 4 *ml* apă bidistilată din biuretă. Se obține astfel diluția 1/500.

Pentru adaptarea ultramicroanalitică se iau 50 *µl* ser și 4,95 *ml* apă pentru diluția 1/100. Din această se ia 1 *ml* și se adaugă 4 *ml* apă (diluția 1/500).

Procedeul de măsurare a intensității radiației emise depinde de tipul fotometrului cu flacără care se utilizează, iar indicațiile sînt trecute în prospect.

Valori normale

Vîrsta	Na (*mEq/l*)		K (*mEq/l*)	
	Limite	$\bar{X}\pm s$	*Limite*	$\bar{X}\pm s$
n · născuți	130—139	134±2,8	3,5—5,1	4,1±0,49
48 ore	130—146	139±4,7	3,9—4,7	4,3±0,030
5 zile	135—146	139±4,7	3,8—5,1	4,6±0,42
luna 1	139—146	141±2,2	4,1—5,3	5,0±0,56
lunile 5— 7	137—155	141±4,2	3,8—5,3	4,5±0,48
lunile 11—15	135—144	139±2,6	3,8—5,4	4,6±0,47
2—3 ani	138—145	141±2,1	3,5—4,7	4,2±0,39
adulți	135—150		3,4—5,4	
	(304—350*mg%*)		(13,3—21,1 *mg%*)	

BIBLIOGRAFIE

1. Richterich, R., *Chimie clinique théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967. 2. O'Brien, D., Ibbott, F. A., *Laboratory Manual of Pediatric Micro- and Ultramicro-Biochemical Techniques*, ed. III, Harper & Row, New-York, 1962.

7.1.2. | CALCIUL

Dozarea calciului se poate face prin trei metode:

a) determinarea prin fotometrie de flacără (este metoda de elecție, dacă aparatul permite determinarea). În flacără de acetilenă se elimină aproape complet interferența sodiului, pe cînd în flacăra de propan această influență este puternică;

b) precipitarea sub formă de oxalat și dozarea permanganometrică a oxalatului de calciu: este o metodă precisă dar foarte lungă și laborioasă;

Scanned with OKEN Scanner

c) metodele complexometrice cu sarea disodică a acidului etilendiamino-tetraacetic (EDTA): sînt foarte rapide, iar precizia este suficientă pentru nevoile clinicii, cu condiţia de a se utiliza un indicator potrivit. Murexidul, folosit în primele tehnici, nu este specific, iar virajul dificil de sesizat. De aceea se recomandă utilizarea unuia dintre indicatorii: calcon (acid 1-hidroxi-2 naftilazol-2 naftol-4 sulfonic); plasma Corinth B (sarea disodică a acidului 1-hidroxi-4-cloro 2,2′-diazobenzen 1,8-dihidroxinaftalen 3,6-disulfonic); calceina (complexul fluoresceină-acid iminodiacetic); indicatorul Patton şi Reeder (acidul 2-hidroxi-1-2-hidroxi-4 sulfo-1 naftilazo-3 naftoic).

7.1.2.1. | DETERMINAREA PRIN FOTOMETRIE DE FLACĂRĂ

Reactivi. Soluţie etalon de Ca, 10 *mg*/100 *ml* (5 *mEq*/*l*): 0,547 *g* $CaCl_2 \cdot 6HO$ (sau 0,277 $CaCl_2$ anhidru), 0,382 *g* KCl pur, 7,635 *g* NaCl şi apă bidistilată ad 1000 *ml*. Conţine 100 *mg* calciu per litru. Se diluează 1/100, la întrebuinţare.

După altă variantă se usucă la 170° timp de 24 ore $CaCO_3$, apoi se răceşte în exicator. Se cîntăresc 250 *mg* într-un creuzet şi se adaugă 6 *ml* HCl 1 *n*. Se încălzeşte la fierbere pînă excesul de HCl se îndepărtează. Se răceşte la 25°C. Se transferă cantitativ într-un balon cotat de 1000 *ml* şi se aduce la semn. Soluţia conţine 6 *mEq*/litru.

Deoarece atît $CaCO_3$ cît şi $CaCl_2$ sînt substanţe higroscopice se recomandă să se stabilească conţinutul exact de calciu din soluţia etalon prin titrare cu EDTA. De ex. se cîntăresc cca 0,38 *g* $CaCl_2$ amhidru, se aduce la 1000 *ml* cu apă bidistilată. Se iau într-un Erlenmayer 20 *ml* soluţie de calciu, 2 *ml* NaOH 1 *n*, se adaugă un vîrf de pipetă Pasteur murexid şi se titrează cu o soluţie 10^{-2} *M* EDTA. Virajul se produce de la roz la violet. Concentraţia calciului se calculează ştiind că 1 *ml* EDTA 10^{-2} *M* corespunde la 0,4008 *mg* calciu.

Tehnica. Cu ajutorul soluţiei etalon se trasează o curbă de etalonare a aparatului, iar pentru determinare se diluează serul 1/100, astfel ca să ne încadrăm în curba de etalonare. Practic, se lucrează cu diluţia 1/100 preparată pentru dozarea potasiului.

Valori normale 9—11 *mg*/100 *ml* (4,5—5,5 *mEq*/*l*).

7.1.2.2. | METODA PERMANGANOMETRICĂ

Principiu. Calciul din ser este precipitat cu oxalat de amoniu sub formă de oxalat de calciu. Precipitatul este dizolvat în acid sulfuric, eliberînd acid oxalic, care se titrează cu permanganat de potasiu.

Reactivi. 1. Soluţie saturată de oxalat de amoniu pur (cca 4%). *2.* Soluţie de amoniac 2% (soluţia concentrată se diluează de cca 20 ori). *3.* Soluţie H_2SO_4 1 *n*. *4.* Soluţie de $KMNO_4$ 0,01 *n*.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica. Se pregătesc două eprubete de centrifugă în felul următor:

	Probă	*Probă în alb*
Apă bidistilată	2 *ml*	2 *ml*
Ser	1 *ml*	—
Oxalat de amoniu	1 *ml*	1 *ml*

Oxalatul de amoniu trebuie adăugat direct în lichid și nu pe pereții eprubetei. Se lasă în repaus cel puțin 30 *min.* (cel mai bine 24 ore). Se centrifughează, se îndepărtează supernatantul prin răsturnarea bruscă a eprubetei și se șterg marginile eprubetei cu o hîrtie de filtru. Se adaugă 4 *ml* amoniac peste sedimentul aflat în eprubetă, se agită prin lovire pînă apare un firicel alb în suspensie, apoi se centrifughează. Se îndepărtează supernatantul și se repetă spălarea cu amoniac, apoi se centrifughează.

După îndepărtarea supernatantului se toarnă peste sediment 2 *ml* H_2SO_4 1 *n*, se amestecă sedimentul cu o baghetă subțire de sticlă și se scufundă eprubeta într-o baie de apă la fierbere timp de 1—2 *min.*, pînă se dizolvă sedimentul. Temperatura lichidului din eprubetă trebuie să nu depășească 70°C, fiindcă altfel se poate deshidrata acidul oxalic (în prezența H_2SO_4).

Soluția fierbinte se titrează cu $KMnO_4$ 0,01 *n*, aflat într-o microbiuretă, pînă la apariția unei colorații roz palidă, care se menține un minut. Temperatura soluției în timpul titrării trebuie să fie peste 50°C.

Calcul. Se notează cu *n* numărul de *ml* $KMnO_4$ 0,01 *n* folosiți la titrarea probei minus numărul de *ml* folosiți la titrarea probei în alb. Deoarece la 1 *ml* soluție $KMnO_4$ 0,01 *n* corespund 0,2 *mg* Ca, iar în determinare s-a folosit 1 *ml* ser, avem:

$n \times 20$ *mg* Ca/100 *ml* și

$n \times 10$ *mEq* Ca/litru

Observații. Pentru o precizie mai mare se vor face două determinări paralele cu fiecare ser. Serul se va separa cît mai repede după coagularea sîngelui.

Valorile normale sînt 9—11,6 *mg*/100 *ml*.

BIBLIOGRAFIE

Predtecenschi, V., Borovskaia, V. M., Margolina, L. T., *Metode de laborator clinic*, Ed. Stat pentru literatură științifică, București, 1953.

Scanned with OKEN Scanner

7.1.2.3. | METODA COMPLEXOMETRICĂ

Principiu. Ionii de calciu formează un complex chelatic în prezența sării de sodiu a acidului etilendiamintetraacetic (EDTA), versen sau complexon III. La sfîrșitul titrării indicatorul își schimbă culoarea cu excesul de EDTA.

Reactivi. 1) Soluție EDTA disodic *M*/800: 0,465 *g* EDTA disodic, cristalizat cu două molecule de apă, și apă bidistilată ad 1000 *ml.* Se păstrează în flacon de polietilenă. *2*) Soluție etalon de calciu 10 *mg*/100 *ml:* $CaCO_3$ pur 0,250 g, HCl 0,1 *N* 9 *ml* și apă bidistilată ad 1000 *ml. 3*) Soluție alcalină de cianură de sodiu: 450 *g* KOH pur, 10 *g* NaCN pur și apă bidistilată ad 1000 *ml. 4*) Indicator Patton și Reeder: o parte reactiv Patton și Reeder și 1000 părți Na_2SO_4 anhidru: se pulverizează fin sulfatul de sodiu anhidru și se majorează cu atenție în el reactivul Patton și Reeder.

Tehnica. În două pahare Erlenmayer se introduc:

	Probă	*Probă în alb*
Ser nehemolizat	2 *ml*	—
Apă distilată	10 *ml*	12 *ml*
Sol. NaCN	1 *ml*	1 *ml*

Se adaugă în fiecare un vîrf de spatulă de indicator și se titrează cu EDTA pînă la virajul din roz în albastru-verde.

Calcul. Notăm cu *N* numărul de *ml* folosiți la titrarea probei și cu *n* numărul de *ml* folosiți pentru martor.

$$\frac{0{,}05 \times (N - n) \times 100}{2} = (N - n) \times 2{,}5 \text{ mg Ca/100 ml.}$$

Observație. Stabilirea titrului soluției de complexon se face titrînd în același mod 2 *ml* soluție de calciu etalon. Dozarea se poate face cu o precizie mai mică luînd 2 *ml* ser, 50 *ml* apă distilată, 0,4 *ml* NaOH 9 *N* (fără NaCN), 1 picătură murexid 1% și titrînd cu EDTA *n*/100 (M/200) pînă la viraj violet *mg* Ca/100 *ml* = (N—n)×10.

BIBLIOGRAFIE

Tronchet, J., Ann. Biol. Clin., 1958, *16*, 459.

7.1.2.4. | DETERMINAREA COMPLEXOMETRICĂ ULTRAMICROANALITICĂ (MICROLITRICĂ)

Principiu. Titrarea complexometrică în prezență de calceină drept indicator. (În soluții foarte alcaline calciul formează cu calceina un complex fluorescent galben-verde strălucitor. În prezența EDTA calciul este chelatat și calceina revine la forma portocalie-roșie nefluorescentă).

Scanned with OKEN Scanner

Aparatură: ultramicrobiuretă, agitator magnetic, farfurioare pentru titrare, din material plastic (se pot înlocui cu dopuri din plastic de la flacoane de medicamente), lampă de ultraviolet cu maxim de emisie 360 Å; lungimile de undă mai mici nu sînt potrivite fiindcă nu permit observarea dispariţiei brusce a fluorescenţei. În lipsa lămpii se va urmări punctul final pe un fond negru sub o iluminare albă fluorescentă.

Reactivi. 1) Soluţie standard de Ca, 10 *mg*/100 *ml*: se prepară ca la metoda fotometriei de flacără sau complexometrică. *2*) Soluţie alcalină de KCN: la 100 *ml* KOH 1,25 *n* se adaugă 50 *mg* KCN. *3*) Indicator calceină: 25 *mg* calceină se dizolvă în NaOH 0,25 *n* şi se aduce la 100 *ml* cu apă. *4*) Sol. EDTA 0,02 *n*: se usucă la 110°C timp de 4 ore EDTA disodic, se răceşte în exicator 12 ore, apoi se cîntăresc 0,372 *g* şi se aduc la 100 *ml* cu apă. Toate soluţiile se păstrează în vase de polietilenă, iar indicatorul de calceină în vas de polietilenă de culoare închisă.

Tehnica. Se pregătesc pentru titrare trei farfurioare:

		Ptrobă	*Probă în alb*	*Standard*
Apă bidistilată	(μl)	—	20	—
Ser	(μl)	20	—	—
Standard Ca	(μl)	—	—	20
Sol. KCN	(μl)	100	100	100
Calceină	(μl)	10	10	10

Se titrează cu EDTA 0,02 *n* pînă la dispariţia fluorescenţei (apariţia unei coloraţii violete concomitente) cu agitare magnetică.

Calcul

$$\frac{\text{Titrare probă} - \text{titrare proba în alb}}{\text{Titrare standard} - \text{titrare proba în alb}} \cdot 10 = mg \text{ Ca}/100\ ml$$

Valori normale. Prin acest procedeu valorile normale sînt ceva mai joase decît cele obţinute prin fotometria de flacără: 8,8—10,5 *mg*/100 *ml*.

Observaţii. 1) Metoda este reproductibilă şi precisă, iar determinarea nu este afectată de magneziu. 2) Punctul final nu se va aprecia niciodată la lumina zilei, în lumină solară sau la lumină artificială galbenă, ci numai sub lumină ultravioletă sau fluorescentă albă. 3) Dacă este necesar cantităţile de reactivi pot fi mărite pentru a lucra la scară microanalitică.

BIBLIOGRAFIE

O'Brien, D., Ibbott, F. A., *Laboratory Manual of Pediatric Micro- and Ultramicro-Biochemical Techniques*, ed. III, Harper & Row, New York, 1962.

Scanned with OKEN Scanner

Calciul se află în plasmă sub trei forme: a) calciu ionic, b) calciu legat de proteine şi c) o mică fracţiune complexată cu citratul. Deşi calciul ionic reprezintă funcţiunea de care depinde excitabilitatea neuromusculară, avînd deci importanţă patogenetică, în laboratorul clinic nu există încă metode de rutină pentru dozarea calciului ionic.

Astfel de măsurători se pot face cu electrode ion selective care nu au intrat încă în practică. Din determinarea calciului total şi a proteinelor se poate evolua doar în mod aproximativ calciul ionizat după o nomogramă (fig. 37).

Pe baza acestei nomograme Zeissler a elaborat următoarea formulă de calcul:

$$mg \text{ calciu ionizat}/100\ ml = \frac{6 \times Ca - \frac{P}{3}}{6 + P} \text{ în care}$$

Ca = calciu total în *mg*/100 *ml*, iar P = proteinemia în g/100 *ml*. De exemplu pentru o calcemie totală de 10 *mg*/100 *ml* şi o proteinemie de 7 g/100 *ml* calciu ionic va fi:

$$\frac{(6 \times 10) - 7/3}{13} = 4{,}4\ mg/100\ ml, \text{ respectiv } 2{,}2\ mEq/1.$$

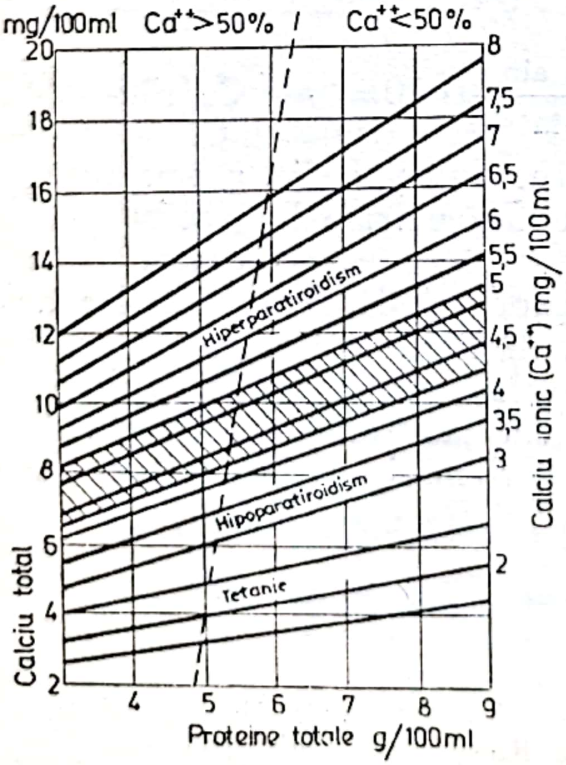


Fig. 37. Nomogramă pentru calculul concentraţiei calciului ionizat (după McLean şi Hastings). Pe abscisă concentraţia în proteine (*g*/100 *ml*), pe ordonată concentraţia calciului total în *mg*/100 *ml*). Punctul obţinut prin coordonate este condus apoi de dreapta oblică corespunzătoare la valorile calciului ionizat aflate în dreapta nomogramei.

Scanned with OKEN Scanner

Valorile normale al calciului ionic sînt de 4,2—5,2 *mg*/100 *ml* respectiv 2,1—2,6 *mEq/l.*

BIBLIOGRAFIE

McLean, F. C., Hastings, A. B., Am. J. Med. Sci, 189 (1935), 601.
Zeissler, E. B., Am. J. Clin. Path, 24 (1954), 588.

7.1.3. | DOZAREA MAGNEZIULUI

Există variate metode de dozare a magneziului în lichidele biologice.

Determinarea prin spectrofotometrie de absorbţie atomică; este specifică şi foarte sensibilă, dar echipamentul necesar nu se află decît în puţine laboratoare clinice, de aceea dăm doar indicaţiile bibliografice: 1) Russelet, F., Girard, M. L., Ann. Biol. Clin., 1967, *25*, 987. 2) Girard, M. L., Rousselet, F., Descube, J., C. R. Acad. Sc. (Paris), 1966, *262*, seria D, 2380.

Determinarea prin fotometrie de flacără este posibilă doar cu anumite tipuri de aparate, iar exactitatea nu este încă suficient demonstrată.

Tehnicile chimice bazate pe precipitarea Mg ca fosfat de magneziu şi amoniu sau cu 8-hidroxi-chinoleină sînt nespecifice şi laborioase.

Metodele care se bazează pe formarea unui colorant roşu de către Mg şi galben de titan prezintă dezavantajul instabilităţii culorii obţinute şi a specificităţii insuficiente.

Metoda complexometrică este încă privită cu rezervă.

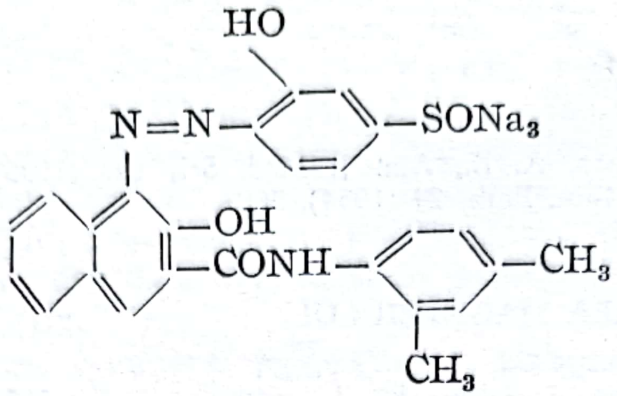
Metoda fluorometrică este specifică, sensibilă şi rapidă, însă necesită aparatură specială.

Metoda de elecţie în această situaţie este cea care utilizează colorantul Mann şi Yoe, reactiv de culoare specific pentru magneziu, care prezintă avantajul sensibilităţii şi rapidităţii.

7.1.3.1. | METODA COLORIMETRICĂ MANN ŞI YOE, MODIFICATĂ DE BOHUON

Principiu. Colorantul Mann şi Yoe: 1-azo-2-hidroxi-3-(2,4-dimetilcarboxanilido)naftalin-1′ (2-hidroxibenzen)-4-sulfonat de sodiu (vezi formula) este albastru. În mediu alcoolic, la *pH* 9—10 acesta formează cu magneziul (în cantităţi de ordinul microgramelor) un complex de

culoare roşie, iar intensitatea coloraţiei este proporţională cu concentraţia Mg.



Formula colorantului Mann şi Yoe.

Material necesar: spectrofotometru sau colorimetru, micropipete de 20 μl (sau mai mici).

Reactivi. Reactivul Mann şi Yoe: se dizolvă 8 *mg* colorant în 75 *ml* alcool absolut (eventual se fierbe cu refrigerent cu reflux), iar după dizolvare se aduce la 100 *ml* cu alcool absolut. Conservare nelimitată la temperatura ambiantă. *2*) Soluţie tampon tetraborat de Na 52 *mM*: se dizolvă 20 *g* borat de Na ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) în 500 *ml* apă caldă. Se aduce la 1000 *ml* cu apă bidistilată. Stabilitatea nelimitată la temperatura camerei. *3*) Soluţie standard Mg, 2 *mg*/100 *ml* (0,824 *mM*): se dizolvă 203 *mg* sulfat de magneziu ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) în apă bidistilată, se adaugă 1 *ml* cloroform şi se aduce volumul la 1000 *ml*. Stabilitate nelimitată la temperatura camerei. *4*) Acid percloric 0,33 *n* (3,3 *g*/100 *ml*): se dizolvă 2,85 *ml* acid percloric 70% în apă bidistilată şi se aduce volumul la 100 *ml*. Stabilitate nelimitată.

Tehnica. Se pregătesc trei eprubete în felul următor:

	Probă	*Probă în alb*	*Standard*
Sol. tampon tetraborat (*ml*)	1,0	1,0	1,0
Ser (*ml*)	0,02	—	—
Standard (*ml*)	—	—	0,02
Apă bidistilată (*ml*)	—	0,02	—
Se amestecă bine, apoi se adaugă:			
Reactiv de culoare (*ml*)	1,0	1,0	1,0

Se agită bine, apoi după 15—30 *min.* (culoarea se dezvoltă în 10 *min.*), se citeşte extincţia probei şi a standardului faţă de proba în alb, în cuvă de 1 *cm* la o lungime de undă cuprinsă între 480—515 *nm* (maximum de extincţie este la 505 *nm*).

Calcul

$$\frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \cdot 2 = mg \text{ Mg/100 } ml; \quad \frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \cdot 1{,}64 = mEq \text{ Mg/litru.}$$

Scanned with OKEN Scanner

Observaţii: *1*) În mod obişnuit proteinele serice nu deranjează dozarea. În cazul serurilor icterice sau lipemice proteinele se îndepărtează în felul următor: se adaugă 20 *µl* ser la 0,2 *ml* acid percloric rece. Se centrifughează puternic, apoi se ia 0,1 *ml* supernatant cu care se face reacţia de culoare. Standardul se va prelucra la fel ca serul. *2*) La concentraţii de peste 4 *mg*/100 *ml* se va dilua serul cu sol. NaCl 0,9% în proporţie de 1:4 şi rezultatul se va multiplica cu factorul de diluţie. *3*) La fiecare serie de determinări se va introduce în mod obligatoriu 1—2 standarduri. Se recomandă ca extincţiile standardului şi ale probei în alb să se măsoare faţă de apă şi să se noteze într-un caiet de control. *4*) Toată sticlăria va fi foarte bine spălată cu amestec de sulfocromic, acid clorhidric şi apoi clătită bine cu apă. *5*) Metoda se poate aplica şi la LCR şi urină. La determinarea Mg în urină, se va acidifica urina cu 1—2 picături de HCl, astfel ca *pH*-ul să fie 3—4. Se diluează 1 *ml* urină cu 3 *ml* apă bidistilată, se amestecă bine, apoi se iau 20 *µl* pentru determinare, iar la calcul rezultatul se înmulţeşte cu 4. *6*) Reactivul Man şi Yoe poate fi furnizat de către firma Schweizerhall.

Valori normale: nou-născuţi: 1,6 — 2,3 *mg*/100 *ml* ser
adulţi 1,9 — 2,9 *mg*/100 *ml* ser
(1,6 — 2,4 *mEq*/litru).

În cazul sîngelui integral, valorile normale sînt: 3,7—4,7 *mg*/100 *ml*, iar pentru hematii: 5,8—6,5 *mg*/100 *ml*.

BIBLIOGRAFIE

1. Mann, C. K., Yoe, J. H., Anal. chem., 1956, *28*, 202. 2. Bohuon, C., Clin. Chim. Acta, *7*, 1962, 811.

7.1.3.2. | METODA CU GALBEN-TITAN

Principiu. În soluţie puternic alcalină, magneziul din ser formează particule coloidale de $Mg(OH)_2$. Colorantul galben titan (galben tiazol) este adsorbit pe aceste particule şi formează un complex colorat în roşu care este apoi stabilizat cu alcool polivinilic şi fotometrat la 540 *nm*,

Reactivi. *1*) Soluţie stoc galben titan. Se dizolvă 0,5 g galben titan în 100 *ml* apă bidistilată. Reactivul este stabil şi se păstrează în sticle de polietilenă. *2*) Reactiv galben titan (soluţie de lucru). Se diluează 2 *ml* din soluţia stoc la 100 *ml* cu apă bidistilată. Se prepară proaspăt de fiecare dată. *3*) NaOH 7,5%. *4*) Reactiv alcool polivinilic: se dizolvă 1 g alcool polivinilic în 400 *ml* apă bidistilată, încălzindu-se uşor. Se răceşte şi se aduce la 1000 *ml* cu apă bidistilată.

Scanned with OKEN Scanner

Soluţia e stabilă şi se păstrează în sticlă de polietilenă. *5*) Standard de magneziu (soluţie stoc). Se dizolvă 8,358 *g* clorură de magneziu $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sau 8,8178 *g* acetat de magneziu $Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ în apă distilată şi se aduce volumul la 1000 *ml*. *6*) Standard de lucru. Se diluează 1 *ml* din soluţia precedentă la 200 *ml* cu apă distilată. Se prepară de preferinţă proaspătă. Această soluţie conţine 5 μg ioni de magneziu/*ml*.

Tehnica

Se pregătesc patru eprubete pentru probă, probă în alb şi două probe standard. În probă se pipetează 2,8 *ml* apă bidistilată şi 0,2 *ml* ser, iar în proba în alb 3 *ml* apă bidistilată. În una din probele standard (standard I) se pipetează 1 *ml* soluţie standard de lucru şi 2 *ml* apă bidistilată, iar în a doua probă standard (standard II) se pipetează 2 *ml* soluţie standard de lucru şi 1 *ml* apă bidistilată. Se adaugă apoi pe rînd în fiecare eprubetă agitîndu-se, 0,5 *ml* reactiv alcool polivinilic, 0,5 *ml* reactiv galben titan (reactiv 2) şi 1 *ml* hidroxid de sodiu 7,5%. După 5 minute se citesc extincţiile probei şi probelor standard, la 540 *nm* faţă de proba în alb. Coloraţia este stabilă timp de o oră.

Calcul. Pentru calcul se foloseşte standardul a cărui extincţie este mai apropiată de extincţia probei de analizat.

Pentru standard I

$$\frac{\text{Extincţia probei}}{\text{Extincţia standard I}} \times 0{,}005 \times \frac{100}{0{,}2} = mg \text{ Mg/100 } ml.$$

sau

$$\frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \times 2{,}5 = mg \text{ Mg/100 } ml.$$

Pentru standard II

$$\frac{\text{Esxtincţia probei}}{\text{Extincţia standard II}} \times 0{,}01 \times \frac{100}{0.2} = mg \text{ Mg/100 } ml$$

sau

$$\frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \times 5 = mg \text{ Mg/100 } ml.$$

Valori normale: 1,8 — 2,9 *mg*/100 *ml* (1,5 — 2,4 *mEq*/1).

BIBLIOGRAFIE

1. Spare, P. D., Am. J. Clin. Path, 37 (1962), 232.

Scanned with OKEN Scanner

7.1.4. | DOZAREA CLORULUI

Clorul reprezintă principalul anion al plasmei şi poate fi dozat prin titrare cu azotat de mercur sau de argint, prin metode colorimetrice sau potenţiometric.

7.1.4.1. | PROCEDEUL TITRIMETRIC SCHALES ŞI SCHALES

Principiu. Ionii de clor sînt determinaţi prin titrare în mediu acid (*pH* sub 3) cu azotat mercuric, cu care formează clorura mercurică nedisociată. Cîtă vreme sînt prezenţi ionii de clor, ionii de Hg^{2+} reacţionează pentru a forma $HgCl_2$. La punctul final ionii de Hg^{2+} în exces reacţionează cu indicatorul (difenilcarbazona) dînd o coloraţie violetă.

Reactivi. *1*) Soluţia de azotat de Hg 0,01 *n*: 1,083 *g* de oxid roşu de mercur sînt dizolvaţi în 11 *ml* HNO_3 conc. şi se diluează cu apă bidistilată la 1000 *ml*. Soluţia se conservă nelimitat în vas de polietilenă. Soluţia se mai poate prepara şi din azotat mercuric: $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$, din care se dizolvă 1,6 *g* în 10 *ml* HNO_3 şi cca 700 *ml* apă, după aceea se aduce volumul la 1000 *ml*. *2*) Soluţia indicator difenilcarbazonă 0,01 *M*: se prepară cît mai puţină soluţie în proporţia: 5 *mg* difenilcarbazona la 2 *ml* metanol sau etanol 95°. Se păstrează în frigider în flacon de culoare brună de preferinţă din polietilenă şi se utilizează timp de o lună. După această perioadă culoarea soluţiei se schimbă din portocalie-roşietică în galbenă, iar detectarea punctului final devine dificilă. *3*) Soluţia H_2SO_4 2/3 *n*: o parte H_2SO_4 conc. şi 53 părţi apă. *4*) Soluţie standard clorură de K, 0,1 *n*: se dizolvă 7,455 *g* KCl (uscat la 110° şi răcit în exicator) în apă bidistilată şi se completează cu apă la 1000 *ml* după ce se adaugă 1 *ml* cloroform. Se conservă un an la frigider, în vas de polietilenă. *5*) Soluţie de wolframat de Na 10%.

Tehnica. Se pipetează în două pahare Erlenmayer de 25 *ml* următoarele soluţii:

	Probă	*Standard*
Ser (*ml*)	0,1	—
Standard clorură (*ml*)	—	0,1
Sol · H_2SO_4 2/3 *n*	1 pic.	1 pic.
Apă distilată (*ml*)	1	1
Indicator difenilcarbazonă	2 pic	2 pic.

Se agită uşor pentru amestecarea componentelor şi se titrează cu soluţie de azotat de mercur 0,01 *n* pînă la prima apariţie a unei culori violete slabe dar persistente. Se notează volumul de soluţie în *ml*.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul. Fiecare *ml* soluţie azotat mercuric corespunde la 0,01 echivalenţi de clor. De aceea avem:

$$mEq \text{ clor/litru} = \frac{1000 \times ml \text{ azotat mercuric} \times 0{,}01}{0{,}1}$$

sau:

ml azotat mercuric × 100 = *mEq*/litru

ml azotat mercuric × 586 = *mg* NaCl/100 *ml*

ml azotat mercuric × 354,5 = *mg* Cl/100 *ml*

Această formulă este valabilă dacă la titrarea soluţiei de KCl s-a folosit 1 *ml* ± 0,02 *ml* azotat mercuric. Dacă acest volum diferă de 1 *ml* se va utiliza formula:

$$mEq \text{ Cl/litru} = \frac{ml \text{ azotat mercuric (probă)}}{ml \text{ azotat mercuric (standard)}} \times 100$$

Observaţii. *1*) Dozarea clorului seric trebuie făcută în decurs de două ore după recoltarea sîngelui. Dacă aceasta nu este posibil, se va separa plasma de hematii. *2*) Soluţia standard KCl este necesară pentru stabilirea titrului reactivului de azotat mercuric. Se vor face în acest caz cel puţin trei determinări paralele. Utilizarea standardului la fiecare serie de determinări evită o depăşire a punctului de echivalenţă (se poate compara culoarea probei titrate cu cea a standardului). *3*) Procedeul determină suma clorurilor şi a bromurilor, dacă acestea din urmă sînt prezente. *4*) În mod obişnuit proteinele nu deranjează titrarea. Serul icteric sau hemolizat se va deproteiniza în felul următor: se pipetează într-un tub de centrifugă: 0,2 *ml* ser, 1,6 *ml* apă distilată, 0,1 *ml* acid sulfuric 2/3 *n* şi 0,1 *ml* wolframat de Na 10%. Se amestecă bine, apoi se centrifughează. Se transferă 1 *ml* din supernatantul clar într-un pahar de 25 *ml*, se adaugă 2 picături indicator şi se titrează cu azotat mercuric. În cazul lichidului deproteinizat, virajul apare la coloraţia albastră şi nu violetă. *5*) Adaptarea ultramicroanalitică a metodei se poate efectua prin reducerea volumului de ser luat în lucru la 20 *µl* (măsurat cu micropipetă), la care se adaugă 0,2 *ml* apă distilată, o picătură acid sulfuric şi 2 picături indicator difenilcarbazonă, ultimii reactivi fiind diluaţi de 5 ori. Titrarea cu azotat mercuric se face folosind o microbiuretă, din care se va titra cca 0,2 *ml;* se titrează într-o farfurioară de plastic (dopul unui flacon de medicamente).

Scanned with OKEN Scanner

Valori normale: în *mEq*/litru.

nou-născut	48 ore	5 zile	luna 1	lunile 5—7	lunile 11—15	2—3 ani	adulţi
96—116*	95—118	102—112	95—110	96—120	102—107	101—108	97—108
105±4,9**	105±5,8	106±3,8	105±6,0	105±5,0	104±2,4	104±2,1	

* = limitele; ** = media±deviaţia standaöd,

Exprimată în *mg* NaCl/100 *ml* concentraţia normală în ser este pentru adulţi de 580—630.

BIBLIOGRAFIE

Schales, O., Schales, S. S., J. Biol. Chem. 1941, *140*, 879.

7.1.4.2. | DETERMINAREA CLORULUI GLOBULAR ŞI PLASMATIC

Raportul clor globular/plasmatic nu aduce decît puţine date practice, notîndu-se o creştere a raportului în acidoză şi o scădere în alcaloză. Folosind metoda Schales şi Schales se procedează în felul următor: 1) Se determină hematocritul şi se notează cu *g* valoarea în procente a elementelor figurate şi cu *p* valoarea în procente a volumului plasmei. 2) Se determină clorul plasmatic folosind volumul de lucru indicat la ser, luînd însă în loc de ser 0,1 *ml* plasmă. 3) Se determină clorul total luînd următoarele cantităţi: 0,4 *ml* sînge total, 3,2 *ml* apă distilată, 0,2 *ml* H_2SO_4 2/3 *n*, 0,2 *ml* wolframat de sodiu, se amestecă bine, şi se centrifughează. Se transferă 2 *ml* din supernatantul clar într-un pahar Erlenmayer pentru titrare, se adaugă 2 picături indicator difenilcarbazonă şi se efectuează titrarea. La exprimarea rezultatului se va înmulţi numărul de *ml* azotat mercuric utilizaţi numai cu 50 în loc de 100, fiindcă 2 *ml* supernatant corespund la 0,2 *ml* sînge. 4) Se calculează acum valoarea clorului globular după formula:

$$\text{Clor globular} = \frac{\text{clor total} \times 100 - \text{clor plasmatic} \times p}{g}$$

Raportul eritroplasmatic va fi: clor globular/clor plasmatic.

Valori normale: clor plasmatic: 365 ± 10 *mg*%
100 — 105 *mEq*/litru
clor globular: 180 ± 10 *mg*%
50 — 52 *mEq*/litru
raport eritroplasmatic: 0,50 — 0,52

7.1.4.3. | METODA SPECTROFOTOMETRICĂ ULTRAMICROANALITICĂ

Principiu. Metoda derivă din metoda Zall de dozare a clorului în apă. Tiocianatul mercuric reacţionează cu ionii de clor dînd clorură mercurică şi punînd în libertate ionii de tiocianat, care sînt dozaţi spectrofotometric la 470 *nm* sub formă de tiocianat feric.

Scanned with OKEN Scanner

Material necesar: micropipete de 10 sau 20 µl, spectrofotometru.

Reactivi. 1) Soluţia apoasă de tiocianat mercuric: 0,70 g ad 1000 *ml*. După o agitare de 3 ore se lasă în repaus şi se filtrează. Se conservă foarte bine la temperatura camerei în flacon brun. *2)* Soluţia apoasă de azotat feric 0,25 *M:* 101 g $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, 31 *ml* HNO_3 ($d = 1{,}40$) şi apă distilată ad 1000 *ml*. Se conservă la temperatura camerei în flacon brun. *3)* Soluţia etalon de NaCl conţinînd 125 *mEq*/litru (7,32‰), 100 *mEq*/litru (5,84‰), 75 *mEq*/litru, 50 *mEq*/litru, 25 *mEq*/litru. Ultimele soluţii se obţin prin diluarea primelor.

Tehnica. Se amestecă 10 (20 µl) plasmă cu 7,5 (15 *ml*) soluţie tiocianat mercuric. Se adaugă 0,2 *ml* soluţie de azotat feric şi după omogenizare se citeşte extincţia la 470 *nm* în cuvă de 2 *cm*, faţă de o probă în alb obţinută prin amestecarea a 0,2 *ml* sol de azotat feric şi 7,5 *ml* tiocianat mercuric. Aceeaşi reacţie se face luînd cîte 10 (20 µl) din soluţiile etalon de NaCl. Ne putem limita doar la etalonul care corespunde la 100 *mEq*/litru.

Calcul. Se face după formula: $\frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \cdot 100 = mEq/\text{litru}$.

Observaţie. Metoda este foarte sensibilă şi rapidă, iar datorită diluţiei foarte mari (1/770) lactescenţa, hemoliza moderată şi bilirubina nu interferează în determinări.

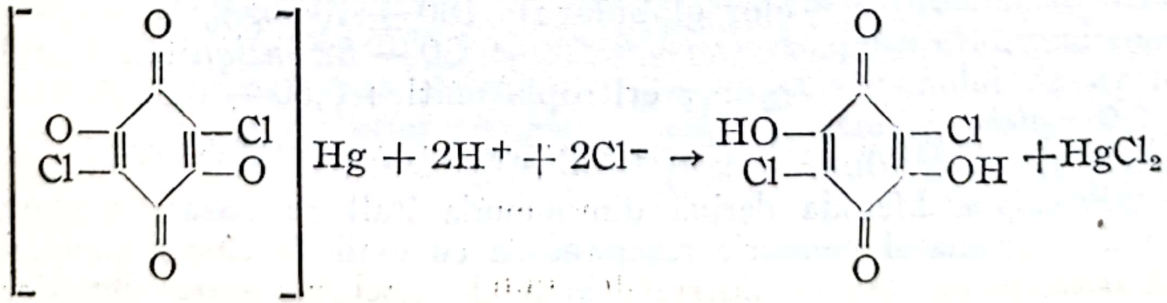
BIBLIOGRAFIE

Giraudet, P., Pre, J., Cornillot, P., Clin. Chim. Acta, 1970, *28*, 323.

7.1.4.4. | METODA FOTOMETRICĂ CU CLORANILAT DE MERCUR

Cloranilatul de mercur a fost utilizat de Barney şi Bertolacini la determinarea anionilor, iar în laboratorul clinic a fost introdus de Zak şi colab.

Principiu. În mediu acid, ionul de clor pune în libertate acidul cloranilic din cloranilatul de mercur insolubil. Acidul cloranilic apare în cantitate echivalentă cu formarea clorurii de mercur şi este intens colorat în roşu-violet. Intensitatea coloraţiei, citită între 490—550 *nm*, este direct proporţională cu concentraţia acidului cloranilic.



Cloranilat de mercur — Acidul cloranilic (roşu-violet)

Reactivi. *1*) Suspensie de cloranilat de mercur: 1 *g* de cloranilat de mercur este adus în suspensie în 100 *ml* H_2SO_4 0,1 *n*. Se agită înainte de utilizare și se pipetează rapid. *2*) Standard de clorură 0,1 *n* (100 *mEq*/litru): 7,4555 *g* de KCl sînt dizolvați în apă bidistilată și volumul se aduce la 1000 *ml*. Stabilă nedefinit la 0,5°C. *3*) H_2SO_4 0,1 *n*.

Tehnica. În trei tuburi de centrifugă se pipetează următoarele cantități de reactivi:

	Probă	*Standard*	*Probă în alb*
Acidul sulfuric 0,1 *n* (*ml*)	2,0	2,0	2,0
Ser (*ml*)	0,02	—	—
Apă bidistilată (*ml*)	—	—	0,02
Sol. standard (*ml*)	—	0,02	—
Cloranilat de Hg (*ml*)	1,0	1,0	1,0

Se agită un minut, apoi se centrifughează. Apoi se citește extincția probei și a standardului față de proba în alb la 546 *nm* (între 490—550 *nm*). Culoarea este stabilă.

$$\textit{Calcul.}\ mEq/\text{litru} = \frac{E\ \text{proba}}{E\ \text{standard}} \cdot 100$$

Observații. *1*) Metoda se poate aplica și în cazul plasmei, LCR, urinei sau altor umori. *2*) Determinarea nu este specifică pentru clor, ea poate fi utilizată pentru determinarea altor anioni ca: sulfat, fosfat (concentrația acestora în lichidele organismului este prea mică pentru a jena reacția). *3*) Suspensia de cloranilat de mercur trebuie bine agitată înainte de pipetare (sau mai bine să fie plasată pe un agitator magnetic) și să se preleveze rapid cantitatea dorită. Metoda fiind foarte sensibilă, sticlăria trebuie să fie bine spălată cu apă deionizată. *4*) Dozarea trebuie făcută în 2 ore de la recoltarea sîngelui. Dacă aceasta nu este posibil, se vor separa eritrocitele de plasmă cît mai repede posibil. *5*) Diferitele produse comerciale de cloranilat de mercur dau rezultate diferite. De aceea, trebuie făcută etalonarea fiecărei șarje de reactivi cu soluția etalon.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique théoretique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

7.1.4.5. | METODA ARGENTOMETRICĂ (VAN SLYKE)

Principiu. Clorurile sînt precipitate cu azotat de argint sub formă de AgCl. Deoarece o parte din clor este legat de proteine, reacția se face în prezența HNO_3 conc., care distruge albuminele serice. Excesul de azotat de argint, care nu a reacționat cu clorul, se retitrează cu tiocianat de potasiu, în prezența alaunului feric ca indicator.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi. *1*) Soluţie de $AgNO_3$ *n*/50 în acid azotic: se dizolvă 0,6795 *g* azotat de argint pro anal. în puţină apă bidistilată şi se completează cu HNO_3 ($d = 1,4$) la 200 *ml*. *2*) Soluţie de sulfocianură de potasiu *n*/50: se obţine din diluarea soluţiei *n*/10 în momentul întrebuinţării (prepararea este descrisă la soluţiile titrate). *3*) Soluţie de alaun feric 5%: se cîntăresc 5 g de sulfat de fier şi amoniu (alaun feric) pro anal. şi se dizolvă în apă, aducînd volumul la 100 *ml*.

Tehnica. Se ia 1 *ml* ser într-un Erlenmayer de 50 *ml* şi se adaugă 8 *ml* soluţie $AgNO_3$. Se pune vasul pe baie de apă la fierbere pînă cînd se obţine o soluţie clară galbenă. Timpul de încălzire este 1—2 ore. Peste soluţia clară se adaugă 6 *ml* apă şi 6 *ml* soluţie de alaun feric. Se titrează excesul de azotat de argint cu soluţia de tiocianat de *K* *n*/50. Titrarea se face pînă la apariţia unei culori slab portocalie.

Calcul. Se scade din numărul (*n*) de *ml* de tiocianat de potasiu întrebuinţaţi la titrare, 0,04 (factor empiric). Cifra rămasă se scade din 8 (nr. *ml*. de azotat de argint). Diferenţa obţinută dă prin înmulţire cu 0,7091 cantitatea de clor în *mg*, care înmulţită cu 100 ne dă procentul de cloruri.

$$8 - (n - 0,04) \cdot 70,91 = mg\ Cl\%.$$

Ex.: la titrare s-a întrebuinţat 1,24 *ml* soluţie sulfocianură de K. $1,24 - 0,04 = 1,2$; $8 - 1,2 = 6,8$; $6,8 \times 0,7091 = 4,82188$ *mg* Cl. Deci 482,188 *mg* Cl/100 *ml*.

7.1.5. | DOZAREA FOSFORULUI SERIC

Reacţia de bază a celor mai multe dintre metodele de analiză a fosforului constă în reducerea fosfomolibdatului în albastru de molibden, folosind ca reducători: acidul ascorbic, hidrochinona, acidul 1,2,4-aminonaftol-sulfonic, metolul. Metoda de elecţie în care dozarea fosforului anorganic seric se face fără deproteinizare prealabilă este cea descrisă în 1955 de Raabe. În celelalte metde se precipită proteinele cu acid tricloracetic şi se dozează fosforul anorganic pe supernatant.

De fapt, în ser fosforul se găseşte sub trei forme:

1) Combinaţii cu proteinele: nucleoprotide, fosfoprotide.

2) Fosfor acidosolubil, care la deproteinizarea cu acid tricloracetic, trece în filtrat. Aici intră: a) fosforul anorganic, pirofosfatul; b) nucleotide (acid adenilic, ATP); c) esteri glucidici (esterii fosforilaţi ai hexozelor); d) acizi trizofosforici; e) acid fosfopiruvic; f) acid fosfogliceric; g) acid creatinfosforic.

3) Fosfolipide.

Scanned with OKEN Scanner

7.1.5.1. DOZAREA FOSFORULUI ANORGANIC (FĂRĂ PRECIPITAREA PROTEINELOR)

Principiu. Fosfatul anorganic este transformat în complex fosfomolibdenic cu acidul molibdenic, fără deproteinizare prealabilă. Apoi, fosfomolibdatul este redus cu acid ascorbic în albastru de molibden, a cărui absorbţie se măsoară fotometric. Pentru stabilizarea culorii se adaugă borax, pentru a împiedica formarea de săruri complexe nespecifice se adaugă pirosulfit de sodiu (metabisulfit), iar amestecul de sulfit şi carbonat reţine proteinele în soluţie (*pH* 8,7). Legea lui Lambert—Beer este valabilă pentru 1—20 *mg* fosfor anorganic/100 *ml.*

Reactivi. 1) Soluţie de pirosulfit 95 *mM*, borax 52 *mM:* 20 *g* tetraborat de sodiu ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) şi 18 *g* pirosulfit de sodiu (metabisulfit) sau 21,1 *g* metabisulfit de potasiu sînt dizolvate în apă şi volumul este adus la 1000 *ml.* Este stabilă 3—4 luni la 4°C. *2*) Soluţie de acid molibdenic (molibdat de amoniu 40,5 *mM*, H_2SO_4 1,2 *n*): se dizolvă 5 *g* molibdat de amoniu în H_2SO_4 1,2 *n* şi se completează volumul la 100 *ml* (H_2SO_4 1,2 *n* se prepară din 3,48 *ml* H_2SO_4 conc. şi apă ad 100 *ml*). Este stabilă 3—4 luni la 4°C. *3*) Soluţie de acid ascorbic 100 *mg/ml.* Se prepară proaspătă în fiecare zi. *4*) Soluţie de carbonat şi de sulfit (396 *mM* carbonat, 56 *mM* sulfit): se dizolvă 7 *g* sulfit de natriu anhidru şi 42 *g* carbonat de natriu anhidru în apă bidistilată şi se aduce la 1000 *ml.* Dacă este tulbure, se filtrează. Este stabilă cîteva luni la 4°C. *5*) Soluţie standard de fosfor 50 *mg*/1000 *ml:* se dizolvă 0,22 *g* KH_2PO_4 în cca 70 *ml* apă distilată, se adaugă 50 *ml* acid sulfuric 1 *n* şi se completează volumul la 1000 *ml* cu apă distilată. Stabilitate nelimitată.

Tehnica. Se pregătesc trei eprubete astfel:

	Probă în alb	*Standard*	*Probă*
Sol. de pirosulfit de borax (*ml*)	0,50	0,50	0,50
Ser (*ml*)	—	—	0,05
Apă distilată (*ml*)	0,05	—	—
Sol. standard fosfat (*ml*)	—	0,05	—
Sol. de molibdat (*ml*)	0,10	0,10	0,10
Sol. de acid ascorbic (*ml*)	0,15	0,15	0,15
Se lasă în repaus 15 min, apoi se adaugă:			
Sol. de sulfit şi carbonat (*ml*)	1,2	1,2	1,2

Se agită bine şi după 15 minute se citesc extincţiile standardului şi a probei faţă de proba în alb, la orice lungime de undă cuprinsă între 600—700 *nm*, la spectrofotometru Spekol sau la fotometru cu filtru roşu.

Calcul

$$mg \text{ fosfor anorganic/100 } ml = \frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \times 5$$

Scanned with OKEN Scanner

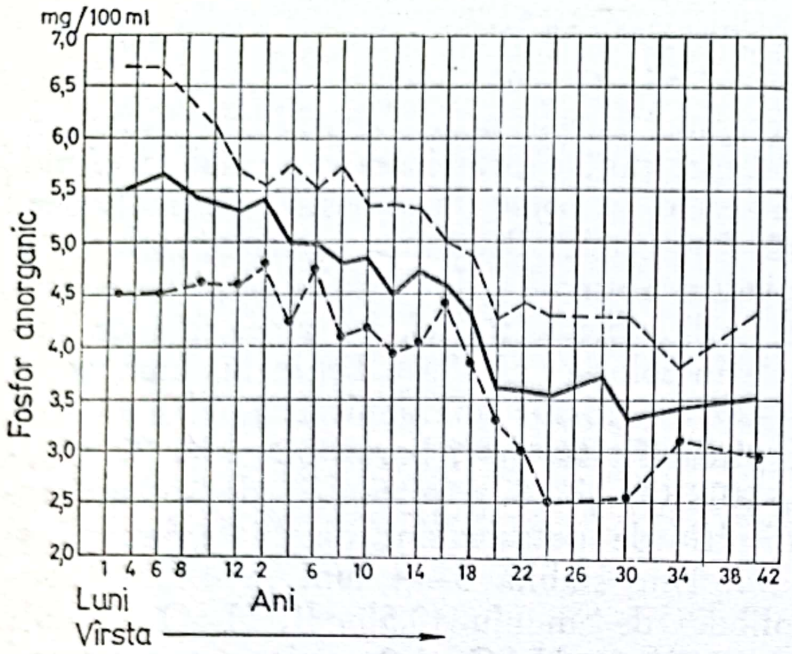


Fig. 38. Variaţia cu vîrsta a valorilor normale ale fosfatului anorganic seric. Linia plină, valorile medii; liniile întrerupte, limitele normalităţii (După J. K. Bullock, Amer. J. Diss. Child, 1930, 40, 725).

Valori normale. În timpul perioadelor de creştere valorile normale sînt mai mari, după cum se vede în fig. 38. La adult valori cuprinse între 3—4,5 *mg*/100 *ml* sînt considerate normale.

Observaţii. *1*) Se obţin rezultate identice indiferent dacă se lucrează pe ser sau pe plasmă. *2*) Serul şi plasma trebuie separate de hematii în decurs de două ore, fiindcă altfel fosforul anorganic poate fi pus în libertate prin scindarea esterilor fosforici. *3*) Dacă se lasă serul sau plasma mai mult de 4 ore, are loc o creştere a fosforului anorganic, probabil prin acţiunea fosfolipazelor şi a fosfatazelor. *4*) Metoda poate fi folosită şi la determinarea fosforului anorganic în LCR sau urină. *5*) Se poate micşora volumul de lucru de 2,5 ori (se ia în lucru 0,02 *ml* ser etc.). *6*) Toată sticlăria folosită va fi bine spălată, lăsînd-o peste noapte în amestec sulfocromic şi apoi spălînd-o cu apă şi cu apă bidistilată.

BIBLIOGRAFIE

1. Raabe, S., Rec. trav. chim. Pays-Bas, 1955, *74*, 652. 2. Richterich, R., *Chimie clinique théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

7.1.5.2. | METODA BRIGGS

Principiu. Fosfatul anorganic formează în mediu acid, împreună cu molibdatul de amoniu, fosfomolibdat. Acesta este redus într-un complex de culoare albastră cu hidrochinonă.

Reactivi. *1*) Soluţie acid tricloracetic 20%. *2*) Soluţie molibdat de amoniu: într-un balon cotat de 500 *ml* se iau 25 g molibdat de amoniu, se dizolvă în 300 *ml* apă, se adaugă 75 *ml* acid sulfuric conc.

Scanned with OKEN Scanner

și se completează la 500 *ml* cu apă. *3*) Soluție de hidrochinonă 1%: se dizolvă 1 g hidrochinonă în apă, într-un balon cotat de 100 *ml*, se adaugă o picătură acid sulfuric și se completează cu apă la 100 *ml*. Soluția se păstrează cîteva zile la frigider, de aceea se vor prepara numai cantitățile necesare. *4*) Soluție sulfit de sodiu ($Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$) 20%. Se va prepara de fiecare dată proaspătă, în cantitățile necesare. *5*) Soluție standard, concentrată, de fosfat: 0,4394 g KH_2PO_4 și apă bidistilată 1000 *ml*. Soluția standard diluată se prepară din 1 *ml* soluție concentrată și apă ad 10 *ml*. Soluția concentrată conține 0,1 *mg* P/*ml*, iar soluția diluată 10 μg P/*ml*.

Tehnica. La 2 *ml* ser sau plasmă se adaugă 4 *ml* apă și 4 *ml* acid tricloracetic 20%. Se agită, se lasă 10 minute în repaus, apoi se filtrează sau centrifughează. Se pregătesc apoi trei eprubete:

	Probă	*Standard*	*Probă în alb*
Supernatant (*ml*)	5	—	—
Sol. fosfat 10 μg/*ml* (*ml*)	—	3	—
Apă (*ml*)	—	2	5
Sol. molibdat (*ml*)	1	1	1
Apoi se adaugă, la intervale de 2 min:			
Sulfit de Na 20% (*ml*)	1	1	1
Hidrochinonă 1% (*ml*)	1	1	1
Apă (*ml*)	2	2	2

Se agită, se așteaptă exact 30 min, apoi se citesc extincțiile probei și ale standardului față de proba în alb, la 600 *nm* (filtru roșu).

$$\text{Calcul mg P/100 ml ser} = \frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \cdot 0{,}03 \cdot 100$$

Observație: Se pot reduce volumele de lucru de de 5—10 ori (0,2 *ml* sau 0,4 *ml* ser etc.).

BIBLIOGRAFIE

Briggs, A. P., J. Biol. Chem., 1922, *53*, 13.

7.1.5.3. METODA CU ACID ASCORBIC (CU PRECIPITAREA PROTEINELOR)

Principiu. Este similar celui descris anterior (metoda Briggs) însă pentru reducere se folosește acidul ascorbic.

Reactivi.1) Soluție acid tricloracetic 20%. *2*) Soluție molibdat de amoniu (se prepară ca la metoda Briggs). *3*) Soluție standard fosfat diluată (ca la metoda Briggs). *4*) Soluție acid ascorbic 1,5% (se prepară proaspătă în cantități mici; se păstrează la frigider 2—3 zile).

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica. Într-un tub de centrifugă se pipetează 0,2 *ml* ser, 2 *ml* apă bidistilată şi 0,8 *ml* soluţie acid tricloracetic 20%, se agită, se lasă în repaus 10 minute, apoi se centrifughează 10 minute, la 3000 rot/*min.* Din supernatant se iau 1,5 *ml*, se adaugă 0,6 *ml* molibdat de amoniu, 0,8 *ml* apă şi 0,1 *ml* soluţie acid ascorbic 1,5%. Se pregăteşte în paralel o probă în alb cu 2,3 *ml* apă, 0,6 *ml* molibdat de amoniu şi 0,1 *ml* acid ascorbic 1,5%. Se citeşte extincţia probei faţă de proba în alb, după 30 *min.* la 600 *nm* (filtru roşu).

Rezultatul se calculează după o curbă de etalonare, care se efectuează astfel:

Reactivi	*Numărul eprubetelor*							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Sol. standard fosfat (10 µg/*ml*) (*ml*)	—	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	0,8	1,0
Apă distilată (*ml*)	2,3	2,2	2,1	2,0	1,8	1,6	1,5	1,3
Sol. molibdat de amoniu (*ml*)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Sol. acid ascorbic 1,5% (*ml*)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Concentraţia (µg P/probă)	—	1	2	3	5	7	8	10

Se agită probele şi după 30 *min.* de la adăugarea acidului ascorbic se citesc extincţiile eprubetelor 2—8 faţă de eprubeta 1, la 600 *nm* (filtru roşu) în cuvă de 1 *cm* sau 2 *cm*. Aceeaşi cuvă se va utiliza şi pentru citirea probelor cu ser.

Calcul. Se reprezintă grafic extincţiile probelor din curba de etalonare în funcţie de cantitatea în µg de fosfor, sau se calculează un factor al curbei de etalonare, aşa cum s-a descris la capitolul „Metode fotometrice". Se calculează apoi cantitatea de µg P/0,1 *ml* ser şi se înmulţeşte cu 1000, obţinînd cantitatea la 100 *ml* ser.

Observaţie. Se poate lucra la scară ultramicroanalitică reducînd de 4 ori volumul de lucru (0,05 *ml* ser etc.).

BIBLIOGRAFIE

Lowry, O., Lopez, J. A., J. Biol. Chem., 1946, *152*, 421.

7.1.5.4. | DOZAREA FOSFORULUI TOTAL ACIDOSOLUBIL

Principiu. Prin mineralizarea substanţelor organice se obţine fosforul sub formă minerală şi apoi se dozează după metodele descrise anterior.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi. *1*) Reactivii utilizaţi pentru dozarea fosforului anorganic. *2*) Acid sulfuric 5 *n* (45 *ml* H_2SO_4 conc. + 260 *ml* apă distilată). *3*) Acid azotic conc. ($d = 1{,}4$). *4*) Soluţie uree 2%.

Tehnica. 5 *ml* filtrat tricloracetic (sau supernatant de la centrifugare — vezi metoda Briggs) împreună cu 5 *ml* acid sulfuric 5 *n* se introduc într-un balon Kjeldahl (15—20 *ml*). Se adaugă 2 perle de sticlă. Se procedează la fel cu 5 *ml* soluţie standard fosfat (obţinută din soluţia concentrată, care conţine 0,1 *mg* P/*ml*; se iau 25 *ml* soluţie stoc şi apă bidistilată ad 200 *ml*; soluţia standard diluată conţine 0,0125 *mg* P/*ml*). Se aşază baloanele direct pe flacără mică, se încălzesc la fierbere uşoară pînă la apariţia vaporilor de SO_3. Se adaugă acid azotic, picătură cu picătură, luînd de pe flacără baloanele. După fiecare picătură de acid azotic, se încălzeşte balonul pe flacără pînă cînd soluţiile devin incolore. Se adaugă în baloane cîte 2 *ml* uree şi se încălzesc numai un moment. Adăugarea ureei are ca scop legarea grupărilor nitroase formate. Se răcesc baloanele la temperatura camerei şi se trece lichidul din ele, în baloane cotate de 50 *ml*. Se spală baloanele Kjeldahl de 2—3 ori cu cîte 2—3 *ml* apă, care se toarnă în baloanele cotate. Se adaugă 3 *ml* molibdat şi cîte 1 *ml* hidrochinonă şi sulfit, apoi se completează cu apă la 50 *ml*. După 30 minute, se citesc extincţiile probei şi ale standardului, faţă de apă distilată, la 600 *nm*, în cuvă de 1 *cm*.

Calcul

$$mg \text{ P total acidosolubil/100 } ml = \frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \cdot 0{,}0625 \cdot 100$$

Dacă din valoarea aflată se scade fosforul anorganic, se obţine valoarea fosforului legat organic acidosolubil (fosfor esterificat).

Valori normale. P esterificat: adulţi 2—5 *mg*/100 *ml*
copii 4—7 *mg*100 *ml*.

BIBLIOGRAFIE

Manta, I., Ciplea, Al., *Metodele laboratorului clinic*, Cartea Românească, Cluj, 1947.

7.1.5.5. TRANSFORMAREA FOSFATULUI ANORGANIC DIN mg/100 ml ÎN mEq/litru

Transformarea fosforului anorganic din *mg*/100 *ml* în miliechivalenţi/litru este o problemă destul de complicată întrucît ionul fosfat se găseşte în ser sub două forme: HPO_4^{--} şi $H_2PO_4^{-}$. La un *pH* fiziologic al sîngelui, aproximativ 80% este sub prima formă şi 20%

sub cea de-a doua. Ţinîndu-se cont că greutatea atomică a P este 31 şi luînd în considerare valenţele celor două forme de fosfaţi

$$mEq\ \text{P/litru} = \left[10\left(0{,}8 \times \frac{2}{31}\right) + 10\left(0{,}2 \times \frac{1}{31}\right)\right] mg\ \text{P/100}\ ml$$

sau după simplificări:

$$mEq\text{/litru} = 0{,}58 \times mg\ \text{P/100}\ ml.$$

Acest factor este valabil însă numai la un *pH* normal al sîngelui întrucît raportul dintre HPO_4^{--} şi $H_2PO_4^{-}$ variază cu *pH*.

7.2. | Osmolaritatea plasmei

Osmolaritatea (presiunea osmotică) este dată de numărul de molecule solvite în plasmă. Aceste particule dizolvate şi de care depinde presiunea osmotică se numesc osmoli (un *mol* = un osmol). Pentru moleculele care disociază fiecare ion reprezintă un osmol. În cazul plasmei sau serului, osmolaritatea se exprimă în miliosmoli, care pentru electroliţi corespund cu miliechivalenţii.

Presiunea osmotică a plasmei poate fi măsurată în funcţie de scăderea punctului de congelare al apei distilate (punct crioscopic). Punctul crioscopic scade cu 0,01°C pentru fiecare 5,4 miliosmoli.

De exemplu pentru o scădere a punctului crioscopic de la 0°C la —0,56°C corespund 272 miliosmoli (milimoli). Determinarea osmolarităţii poate fi efectuată astăzi cu mare precizie şi rapiditate (în cîteva minute) cu ajutorul osmometrelor automatizate care furnizează rezultate directe în miliosmoli la litru (Electronic Semi-Micro-Osmometer-Knauer). Valorile normale obţinute cu această metodă sînt de 285—290 miliosmoli/litru. Conform calculului (suma cationilor şi anionilor) osmolaritatea ar fi de 300—310 miliosmoli. Discrepanţa între această valoare şi cea obţinută prin determinări directe se explică probabil prin interacţiunea dintre ioni şi prin reducerea activităţii osmotice. În general, conţinutul în sodiu al serului furnizează o măsură destul de corectă a osmolarităţii. În absenţa unei retenţii azotate sau a unei hiperglicemii severe, osmolaritatea (miliosmoli/litru) = 2,1 × concentraţia sodiului *mEq/l*). În caz de azotemie marcată se poate calcula numărul de milimoli (miliosmoli) daţi de uree înmulţîndu-se valorile ureei serice (*mg*/100 *ml*) cu 10 şi împărţindu-se la 60 (greutatea moleculară a ureei). Pentru a afla numărul de milimoli daţi de glucoză, valorile glicemiei

Scanned with OKEN Scanner

în *mg*/100 *ml* se înmulțesc cu 10 și se divid cu 180 (greutatea moleculară a glucozei).

glicemie = 360 *mg*/100 *ml*: $\frac{360 \times 10}{180}$ = 20 milimoli dați de glucoză.

Scăzînd numărul de milimoli dat de uree și glucoză din valorile obținute cu ajutorul osmometrului se obține numărul de milimoli dat de electroliți (respectiv miliechivalenți electroliți).

BIBLIOGRAFIE

Hoffmann, W. S., *The Biochemistry of Clinical Medicine*, Year Book Medical Publishers, Chicago, 1970.

7.3. Interpretarea modificărilor patologice ale echilibrului hidro-mineral

Modificările patologice ale metabolismului apei și sodiului realizează următoarele aspecte mai caracteristice:

a) *Pierderea în exces a apei* (*deficitul de apă*), care se poate instala în caz de: a) secreție sudorală excesivă; b) diareei cu scaune fluide; c) vărsături abundente; d) diabet insipid; e) polipnee, f) aport insuficient.

Se constată o scădere a volumului extracelular, hemoconcentrație, o creștere a sodemiei și a presiunii osmotice. Ureea sanguină poate fi ușor crescută.

b) *Pierderea în exces a sărurilor* (*deficitul de sodiu*), se constată în: a) pierderi de apă și sodiu (vărsături, diaree, transpirații) urmate de administrarea de apă per os sau în perfuzii; b) pierderi renale de săruri în boala lui Addison sau în lipsa de răspuns al tubilor renali la aldosteron (pseudo-Addison). Laboratorul evidențiază o hemoconcentrație și o creștere moderată a ureei. Mai tîrziu apar hiponatremia și scăderea presiunii osmotice.

c) *Retenție în exces a apei* (*excesul de apă*) survine în două situații în care mecanismele homeostatice sînt inadecvate: a) în caz de administrare necontrolată de lichide sărace în sodiu la un bolnav cu insuficiență renală; b) administrarea de lichide hipotone pe fondul unei secreții crescute de vasopresină (bolnavi infectați, stări postoperatorii). Laboratorul evidențiază o scădere a sodiului plasmatic și bineînțeles o hemodiluție.

Scanned with OKEN Scanner

d) *Excesul de săruri* survine rareori în formă pură; poate fi întîlnit după administrarea intravenoasă de soluţii hipertonice la bolnavii anurici sau la naufragiaţii care ingerează apă de mare. Se constată o hipernatremie şi o creştere a presiunii osmotice.

e) *Retenţia de apă şi săruri* duce la o creştere a lichidului interstiţial şi realizează edemele cu mecanisme de producere diferenţiată în funcţie de condiţiile de apariţie (ciroze, afecţiuni renale, insuficienţă cardiacă). De notat că în astfel de situaţii concentraţia plasmatică a sodiului nu este crescută fiind mai adeseori scăzută. În schimb sodiul extracelular total determinat cu sodiu marcat este mult crescut.

Modificările concentraţiei sodiului plasmatic urmează de regulă variaţiile osmolarităţii, constatîndu-se hipersodemie în hipertoniile osmotice şi hiposodemia în hipotonie osmotică. Clorul plasmatic scade după pierderi saline (stenoză pilorică cu vărsături incoercibile) şi creşte în unele acidoze (acidoză hipercloremică).

Anomaliile metabolismului potasiului realizează:

a) *Depleţia de potasiu,* care poate surveni în: a) vărsături, diaree, fistule intestinale; b) pierderi pe cale urinară în caz de insuficienţă a procesului de reabsorbţie tubulară a potasiului (de ex. în perioada poliurică a unei insuficienţe renale acute sau în diabet zaharat, cu poliurie şi acidoză, tratat cu insulină). Pierderi urinare de potasiu survin şi în caz de hiperaldosteronism. Alcalozele evoluează de regulă cu hipopotasemie.

În caz de deshidratare şi reducere a volumului lichidului extracelular, depleţia în potasiu poate fi mascată şi se evidenţiază abia după refacerea volumului plasmatic în urma administrării de lichide.

b) *Hiperpotasemiile* care survin atunci cînd viteza de ieşire a potasiului din celule depăşeşte posibilităţile de excreţie. Creşterea potasiului seric se întîlneşte în special în insuficienţele renale acute cînd potasemia poate depăşi *7 mEq/1.* Creşteri moderate se constată în insuficienţele suprarenale, în caz de tratament cu inhibitori ai aldosteronei (aldocton) sau după administrări terapeutice, la un bolnav oliguric. Acidozele evoluează de regulă cu hiperpotasemie.

BIBLIOGRAFIE

1. Baciu, I., *Fiziologie,* Editura didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1970. 2. Christensen, H. N., *Body Fluids and the Acid-Base Balance,* Ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 1964.

Scanned with OKEN Scanner

7.4. | Interpretarea modificărilor patologice ale calciului, fosforului şi magneziului seric

Anomaliile metabolismului calciului, fosforului şi magneziului pot fi astfel grupate:

Hipocalcemiile pot interesa fracţiunea calciului nedifuzibil (legat de proteine) sau fracţiunea calciului ionic. Scăderi ale calciului legat de proteine survin în hiperhidratări, sindrom nefrotic şi denutriţie şi nu au efect asupra excitabilităţii neuromusculare. Scăderi ale calciului ionic survin în hipoparatiroidism (asociate cu o creştere a fosfaţilor), în rahitism şi osteomalacie (asociate cu o scădere a fosfaţilor şi creşterea fosfatazei alcaline) şi în insuficienţe renale (asociate cu o creştere a fosfaţilor şi bineînţeles a ureei sanguine).

Hipercalcemiile, datorate creşterii fracţiunii legate de proteine, survin în deshidratări cu hemoconcentraţie.

Creşteri de calciu ionic se întîlnesc mai ales în hiperparatiroidism (asociate cu scăderi ale fosfaţilor şi creşterea fosfatazei alcaline). Creşteri moderate pot fi depistate în tireotoxicoză, supradozaj de vitamine D precum şi după ingestie de cantităţi mari de preparate de calciu sau de lapte.

Scăderea magneziului se poate constata în urma diareelor şi vărsăturilor, în unele cazuri de hiperparatiroidism, în hiperaldosteronism, după diuretice şi în unele ciroze alcoolice în special în crizele de delirium tremens.

Creşterea magneziului seric se întîlneşte rareori în mod izolat. Ea poate fi constatată în insuficienţa renală alături de retenţia altor substanţe.

BIBLIOGRAFIE

1. Hoffman, W. S., *The Biochemistry of Clinical Medicine,* Year Book Medical Publishers, Chicago, 1970. 2. Zilva, I. F. and Pannall, P. R., *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment,* Lloyd—Luke (Medical Book) Ltd, London, 1972.

7.5. | Explorarea echilibrului acido-bazic

Întrucît echilibrul acido-bazic al sîngelui depinde de raportul dintre ionul bicarbonat şi acidul carbonic şi dat fiind că perturbările echilibrului acido-bazic însoţesc de regulă dereglările metabolismului hidromineral, explorarea echilibrului acido-bazic va fi discutată în acest context. După formula lui Henderson şi Hasselbach:

$$pH = 6{,}1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

Scanned with OKEN Scanner

Introducerea microechipamentului Astrup în explorarea echilibrului acido-bazic reprezintă un progres însemnat în acest domeniu. Spre deosebire de măsurătorile de bicarbonaţi şi de *pH* efectuate în plasmă, metoda Astrup ţine cont de rolul tamponului de hemoglobinat şi de intervenţia anhidrazei carbonice din eritrocite. Aceasta a făcut ca determinările volumetrice ale bicarbonaţilor (metoda Van Slyke) să fie depăşite. În cele ce urmează vom descrie metoda Astrup, iar pentru orientare vom reda o metodă titrimetrică rapidă de dozare a bicarbonaţilor.

7.5.1. | METODA ASTRUP

Principiul metodei. Metoda Astrup se bazează pe reacţia invers proporţională între presiunea parţială a CO_2(P_{CO_2}) şi valorile de *pH* din sînge.

Este o micrometodă, determinările făcîndu-se din sînge capilar. Se măsoară trei valori de *pH* cu ajutorul cărora dintr-o nomogramă specială se pot calcula factorii principali ai echilibrului acido-bazic. Măsurătorile de *pH* se efectuează într-o probă de sînge recoltat în condiţii anaerobe (*pH* actual) şi în alte două probe unde sîngele a fost echilibrat în prealabil cu cîte un amestec de O_2—CO_2 de concentraţie cunoscută. (O probă expusă la P_{CO_2} scăzut şi o altă probă expusă la P_{CO_2} crescut).

Nomograma construită de O. Siggaard — Andersen şi K. Engel, reprezintă valoarea presiunii parţiale a bioxului de carbon P_{CO_2} în funcţie de *pH*. La baza nomogramei stă observaţia că în condiţii fiziologice relaţia dintre log. P_{CO_2} şi *pH* e reprezentată de o linie dreaptă, care este de fapt linia de echilibrare a bioxidului de carbon (fig. 39).

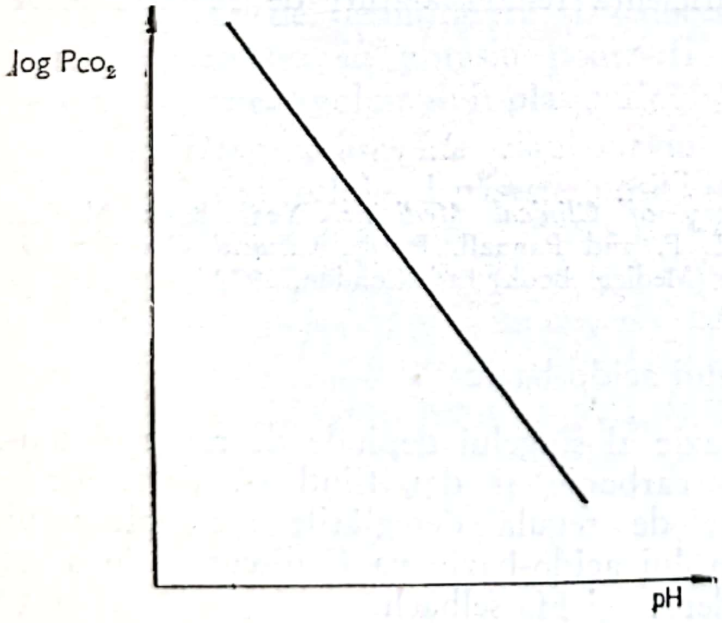


Fig. 39. Relaţia dintre P_{CO_2} (valori logaritmice) şi *pH* (explicaţie în text).

Linia de echilibrare a CO_2 se obţine prin legarea punctelor corespunzătoare valorilor de *pH* ale sîngelui obţinute după echilibrarea acestuia cu un amestec de O_2—CO_2 cu diferite valori ale P_{CO_2}. Panta dreptei este în funcţie de capacitatea de tamponare a sîngelui, iar poziţia dreptei de-

Scanned with OKEN Scanner

pinde de conţinutul de baze din sînge. Prin urmare din poziţia şi înclinarea dreptei se pot trage concluzii referitoare la capacitatea de tamponare şi la conţinutul de baze al sîngelui. Luînd de exemplu trei probe — A, B, C, — unde C este sînge integral (Hb = 20 g/100 *ml*); A = plasma acestui sînge (Hb = 0); B = amestec între A şi C (Hb = 10 g%). Cele trei probe au acelaşi conţinut de baze, se deosebesc însă prin capacitatea lor de tamponare deoarece au un conţinut diferit de hemoglobină. Determinînd pentru cele trei probe liniile de echilibrare a bioxidului de carbon se obţin trei drepte cu inclinaţii diferite, care se întretaie într-un punct. Acest punct este caracteristic pentru conţinutul în baze al celor trei probe (liniile de echilibrare a oricărei probe de sînge cu acelaşi conţinut bazic ar trece de asemenea prin acelaşi punct). Adăugînd celor trei probe o cantitate egală de bază (15 *mEq/l*) şi determinînd din nou liniile de echilibrare, se obţin dreptele A_2, B_2, C_2, care se întretaie la rîndul lor într-un punct. Acest punct însă, datorită conţinutului mărit de baze, se găseşte în altă poziţie, la o valoare mai crescută de *pH*. Dacă se adaugă probelor, A, B, C aceeaşi cantitate de acid (15 *mEq/l*), dreptele obţinute A_1, B_1, C_1 se vor întretăia într-un nou punct aflat la o valoare mai mică de *pH*. Folosind diferite concentraţii de acizi şi baze, adăugate la cele trei probe, se observă că punctele de intersecţie a dreptelor de echilibrare descriu o curbă denumită *exces de baze* (EB), reprezentată în fig. 40. Punctul de intersecţie al acestei curbe cu linia de echilibrare a CO_2 pentru o probă oarecare de sînge exprimă valoarea excesului de bază în *mEq/l* a probei respective.

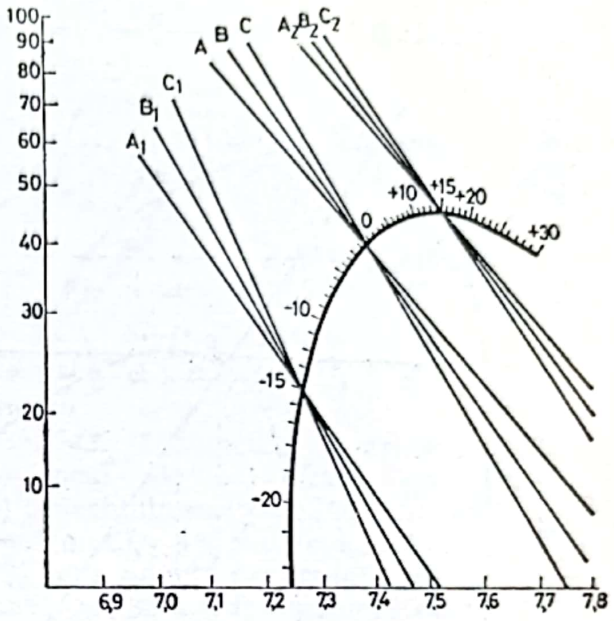


Fig. 40. Relaţia dintre curba de echilibrare a CO_2 la diferite valori ale concentraţiei de baze. Pe abscisă valorile de *pH*. Pe ordonată log P_{CO_2}. (Explicaţia în text).

În mod similar se poate construi şi curba de *baze tampon* (BT). Liniile de echilibrare a sîngelui şi plasmei cu un conţinut identic de baze tampon se întretaie de asemeni într-un punct. Variind conţinutul bazei tampon, acest punct se deplasează de-a lungul unei curbe, care reprezintă curba bazei tampon. Punctul de intersecţie a curbei de echilibrare a probei de sînge cu curba BT redă valoarea bazei tampon a probei.

Scanned with OKEN Scanner

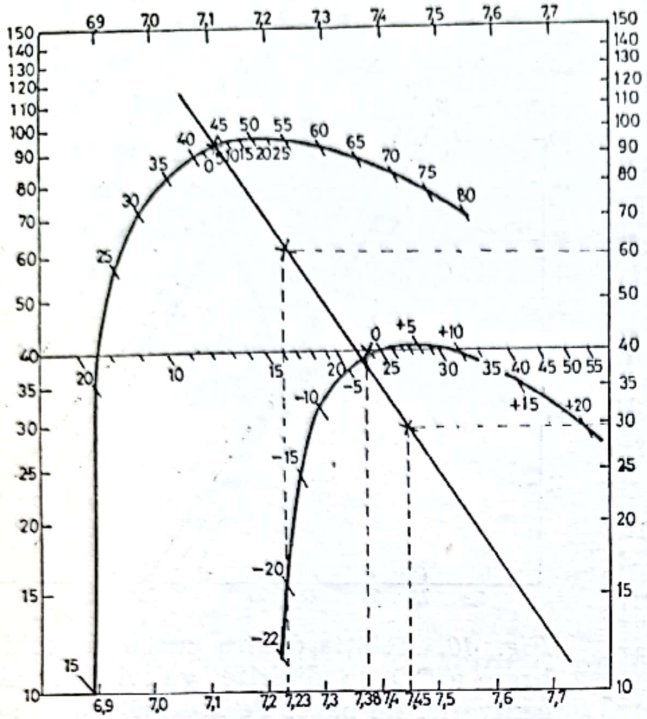


Fig. 41. Nomograma completă Siggaard-Andersen şi K. Engel (explicaţia în text).

Dacă reprezentăm în sistemul de coordonate şi scala *bicarbonatului standard* (SB), care poate fi calculată din ecuaţia Henderson—Hasselbach, se obţine nomograma completă Siggaard—Andersen şi K. Engel. (fig. 41).

Cu metode grafice se mai pot afla din nomogramă următoarele date: bicarbonat actual şi CO_2 total.

Reactivi şi materiale

1. Tuburi capilare heparinizate.

2. Amestec de O_2—CO_2. Aparatul Astrup se livrează cu două bombe în care concentraţiile bioxidului de carbon sînt diferite şi anume 4% şi 8% (v/v). Transformarea concentraţiei în presiune parţială se face pe baza următoarei formule:

$$P_{CO_2} = \frac{B - 50}{100} \times CO_2\%$$

unde B = presiunea barometrică. Cifra 50 reprezintă tensiunea vaporilor de apă la 38°C.

3. Soluţii tampon

a) Tampon fosfat $pH = 7{,}384$ la 38°C, 1,179 g KH_2PO_4 sicc., + 5,395 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, se dizolvă, la 20°C, în apă bidistilată lipsită de CO_2 după care se completează la 1000 *ml*.

b) Tampon fosfat, $pH = 6{,}84$ la 38°C. 3,402 g KH_2PO_4 sicc., + 4,450 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ se dizolvă în apă bidistilată (= CO_2) şi se completează la 1000 *ml*.

Soluţiile se păstrează bine închise. Se menţin aproximativ 60 zile.

Descrierea aparatului

Pentru determinarea *pH*-ului se foloseşte microelectrodă de sticlă care permite efectuarea măsurătorii din 25 microlitri de sînge (fig. 42).

Scanned with OKEN Scanner

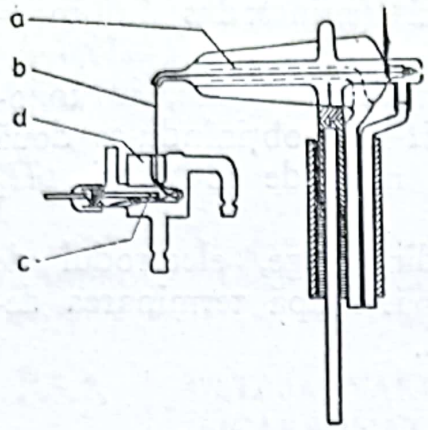


Fig. 42. Electrozii aparatului Astrup : a) electrodă de sticlă ; b) capilar din plastic pentru aspirația produsului de analizat ; c) electrod de calomel ; d) electrolit (soluție saturată KCl).

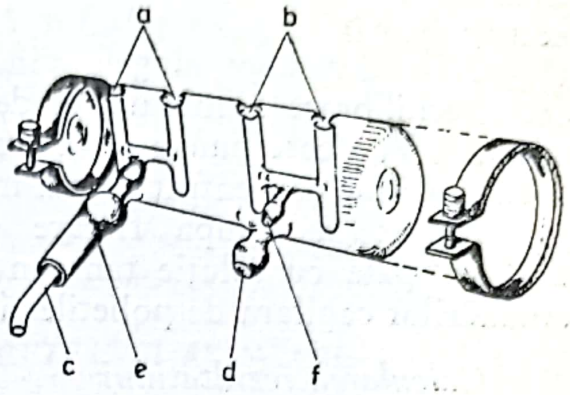


Fig. 43. Tonometrul aparatului Astrup : a) locul de echilibrare cu CO_2 4% ; b) de echilibrare cu CO_2 8% ; c) conducte pentru CO_2 4% ; d) conducte pentru CO_2 8% ; e) conductă pentru intrarea apei termostată la 38°C ; f) conductă pentru ieșirea apei termostatate.

Electrodul de referință este confecționat din calomel (ca electrolit se folosește o soluție saturată de KCl). Aparatul este prevăzut cu pompă de vid și un termostat care permite menținerea temperaturii la 38°C.

Controlul *pH*-metrului se face determinînd *pH*-ul aceleiași soluții tampon sau probă de sînge de mai multe ori. Rezultatele sînt reproductibile în cazul cînd diferența între măsurări nu depășește ±0,003 unități *pH*.

Echilibrarea (amestecarea) sîngelui cu cele două amestecuri de CO_2—O_2 se realizează în *tonometru,* care permite efectuarea a două probe paralele (fig. 43).
Durata echilibrării este de 5 minute.

Tehnica de lucru

1. Recoltarea sîngelui. Se recoltează sînge capilar în 3 tuburi capilare heparinizate (tuburile se livrează cu aparatul Astrup). Pentru menținerea condițiilor anaerobe, capetele tuburilor se astupă cu ceară neutră, aflată în trusa de recoltare. După astuparea unui capăt se introduce în partea opusă a capilarei un cuișor de oțel, se închide și capătul celălalt, și se mișcă din exterior cu un magnet, cuișorul împiedicînd astfel coagularea sîngelui.

2. Măsurarea pH-ului

a) Ajustarea aparatului prin determinări de *pH* în cele două soluții tampon (6,84 și respectiv 7,384);

Scanned with OKEN Scanner

b) măsurarea *pH*-ului actual al sîngelui (neintrodus în tonometru);

c) se introduce sîngele din cele două capilare rămase, în tonometru, echilibrare 5 minute, şi determinarea *pH*-ului obţinîndu-se două valori: pH_1 (corespunzător concentraţiei mai mici de CO_2) şi pH_2 (corespunzător concentraţiei mai mari de CO_2).

Observaţie. După fiecare determinare din sînge, electrodul de sticlă se spală cu soluţie tampon şi apoi cu apă. După terminarea determinărilor capilara de polietilenă se ţine în apă.

Calcularea rezultatului

1. Pe baza formulei de mai sus se transformă concentraţia CO_2 din volume % în P_{CO_2} (vezi pag. 260).

2. Se fixează punctele corespunzătoare la pH_1 obţinut după echilibrarea sîngelui cu $CO_2 = 4\%$ şi pH_2 aparţinînd concentraţiei de $CO_2 = 8\%$. Totdeauna $pH_1 \geqslant pH_2$. Prin unirea celor două puncte se obţine o linie dreaptă care reprezintă linia de echilibrare a CO_2-ului.

3. Parametri echilibrului acido-bazic se află în felul următor:

a) *Presiunea parţială a bioxidului de carbon* (P_{CO_2}) se obţine ducînd o dreaptă din punctul corespunzător valorii *pH*-ului actual. Punctul corespunzător intersecţiei cu linia de echilibrare proiectat pe ordonată reprezintă P_{CO_2};

b) *Excesul de baze* se obţine la intersecţia curbei EB;

c) *Baze tampon* (BT) se află la intersecţia cu curba BT;

d) *Bicarbonatul standard* în mod analog se obţine prin citirea valorii intersecţiei pe dreapta bicarbonatului standard;

e) *Bicarbonatul actual* se poate afla ducînd o linie dreaptă cu o înclinaţie de 45° pe dreapta corespunzătoare bicarbonatului standard, din punctul corespunzător *pH*-ului actual de pe linia de echilibrare.

f) CO_2 total (liber şi legat sub formă de HCO_3^-) se obţine prin calcul: total $CO_2 = 0{,}03 \cdot P_{CO_2} + AHCO_3^-$; ($AHCO_3^-$ = bicarbonat actual).

Valori normale

P_{CO_2} = 40—45 *mm* Hg; Exces bază (EB) = ±2 *mEq/1*, în medie 0 *mEq/1;* Baze tampon (BT) = 46—52 *mEq/1;* Standard bicarbonat = 22—27 *mEq/1*; bicarbonat actual = 22—27 *mEq/1;* CO_2 total = 25—27 *mEq/1.*

Pentru înţelegerea mai bună a mersului analizei să luăm un exemplu. Fie P_{CO_2} = 29 *mm* Hg (4 vol%); P_{CO_2} = 60 *mm* Hg (8 vol%). *pH* actual = 7,38; pH_1 = 7,45; pH_2 = 7,23. Prin utilizarea nomogramei se obţin următoarele rezultate (v. figura 41).

Scanned with OKEN Scanner

P_{CO_2} = 40 *mm* Hg; EB = —2 *mEq/l;* BT = 43 *mEq/l;* $StHCO_3^-$ = 23 *mEq/l;* $AHCO_3^-$ = 23 *mEq/l;* CO_2 total = 0,03 P_{CO_2} + $AHCO_3$ = 1,2 + 23 = 24,2 *mEq/l.*

BIBLIOGRAFIE

1. Astrup, P., Clinical Chemistry, 1961, *7*, p. 1. 2. Siggaard—Andersen, O., *The Acid-Base Status of the Blood*, Ed. Munkgaard, Coppenhagen, 1966.

7.5.2. DETERMINAREA RAPIDĂ A REZERVEI ALCALINE (BICARBONAT ACTUAL)

Principiu. Bicarbonaţii din ser sînt descompuşi cu acid azotic, iar excesul de acid azotic se titrează în prezenţă de roşu de fenol cu hidroxid de sodiu.

Reactivi. 1) Soluţie acid azotic 0,1 *N*. *2*) soluţie roşu de fenol 0,04% în alcool etilic de 60°. *3*) soluţie de hidroxid de sodiu 0,1 *N*.

Tehnica. La 1 *ml* ser nehemolizat se adaugă 0,7 *ml* soluţie acid azotic 0,1 *N* şi 4 picături soluţie roşu de fenol 0,04%. Se agită timp de 2 minute pentru îndepărtarea bioxidului de carbon rezultat din descompunerea bicarbonaţilor. Se titrează cu soluţie de hidroxid de sodiu 0,1 *N* cu o pipetă de 1 *ml* (pornind de la gradaţia 0,7 *ml*) pînă la primul viraj portocaliu.

Calcul. Bicarbonat actual *mEq/l* = nr. *ml.* NaOH 0,1 *N* rămaşi în pipetă după titrare × 100.

Observaţii. 1) Sticlăria utilizată la dozarea bicarbonatului actual va fi spălată chimic şi limpezită cu apă distilată. *2*) toţi reactivii. se prepară cu apă bidistilată şi se verifică exactitatea lor astfel: la 1 *ml* HNO_3 0,1 *N* în prezenţă de 4 picături roşu de fenol trebuie să corespundă 1 *ml* soluţie NaOH 0,1 *N*.

BIBLIOGRAFIE

Scribner, Orvosi Hetilap, 1963/12, p. 556.

7.5.3. INTERPRETAREA MODIFICĂRILOR PATOLOGICE ALE ECHILIBRULUI ACIDO-BAZIC

Modificările patologice ale echilibrului acido-bazic pot fi clasificate în funcţie de raportul dintre bicarbonat (HCO_3^-) şi acidul carbonic (H_2CO_3). Scăderea acestui raport duce la acidoză iar creşterea lui produce alcalozele. Dacă scăderea raportului $\frac{HCO_3^-}{H_2CO_3}$ se dato-

Scanned with OKEN Scanner

TABEL 16

COMPORTAREA UNOR DATE DE LABORATOR (EXEMPLE ILUSTRATIVE) ÎN CÎTEVA DEREGLĂRI CARACTERISTICE ALE ECHILIBRULUI ACIDO-BAZIC ŞI DIFERITELE CAUZE CARE POT PROVOCA ACESTE DEREGLĂRI.

VALORI PE *pH* ÎNTRE 7,35 ŞI 7,45 SÎNT CONSIDERATE CA FIIND ÎN LIMITELE FIZIOLOGICE DE OSCILAŢIE.

Starea echilibrului acido—bazic		*pH*	HCO_3^- (*mEq/l*)	P_{CO_2} (*mm* Hg)	* $H_2CO_3^-$ *mEq/l*	$\frac{H_2CO_3^-}{H_2CO_3}$	** K+ (*mEq/l*)	*Cauze*
Normală		7,40	24,10	40	1,20	20,00	4,5	
Acidoză metabolică	compensată	7,39	15,20	26	0,70	19,50	5,6**	Acido-cetoză diabetică, Inaniţie, ingestie de ClH_4, insuficienţă renală, diarei, fistule intestinale.
	decompensată	7,17	11,20	32	0,96	11,66	5,9	
Acidoză respiratorie	compensată	7,36	27,60	50	1,50	18,40	5,4	Pneumonie, emfizem, insuficienţă cardiacă, astm, depreimarea centrului respirator (intoxicaţie cu morfină), paralizia muschilor respiratori)
	decompensată	7,29	30,00	64	1,92	15,60	5,8	
Alcaloză metabolică	compensată	7,40	30,00	50	1,50	20,00	4,0	Stenoză pilorică, ingestie de alcaline.
	decompensată	7,55	49,80	58	1,74	28,62	3,4	
Alcaloză respiratorie	compensată	7,42	18,90	30	0,90	21,00	4,2	Ridicări la altitudine, Hiperventilaţie în caz de hiperexcitabilitate a centrului respirator (leziuni nervoase, histerie, intoxicaţie cu salicilaţi)
	decompensată	7,51	18,50	25	0,75	26,00	3,8	

* Valorile H_2CO_3 (in *mEq/l*) se obţin înmulţind P_{CO_2} cu 0,03; cunoscîndu-se doi din cei trei parametri principali ai echilibrului acido-bazic (PCO_2, HCO_3^-, *pH*) se poate calcula pe cel de-al treilea conform formulei lui Henderson şi Hasselbach. (vezi pag. 257)

** Potasiul seric este scăzut în acidoza produsă de tratamentul cu diuretice de tipul acetozalamidei sau în acidoza tubulară renală. De asemeni potasiul poate scădea în cursul terapiei unei acidoze diabetice.

Scanned with OKEN Scanner

reşte scăderii numărătorului, se vorbeşte de acidoze metabolice, iar dacă această modificare e cauzată de o creştere a numitorului, se vorbeşte de o acidoză respiratorie. Creşterea raportului $\frac{HCO_3^-}{H_2CO_3}$, consecutivă unei creşteri a numărătorului, realizează alcaloza metabolică, iar modificarea indusă de o scădere a numitorului duce la aşa-zisa alcaloză respiratorie. În funcţie de modificările de *pH* se poate vorbi de acidoza sau alcaloza compensată (*pH* — nemodificat) sau decompensat (modificări de *pH* care depăşesc limitele de 7,35—7,45).

În tabelul alăturat reproducem comportarea unor date de laborator în cîteva dereglări caracteristice ale echilibrului acido-bazic şi diferitele cauze care pot provoca aceste dereglări. De menţionat că, de regulă, acidozele se însoţesc de o creştere a potasemiei, iar alcalozele de o hipopotasemie.

Bazele tampon obţinute cu metoda Astrup reprezintă suma anionilor tampon din sînge (proteinat, bicarbonat, hemoglobinat) care pot accepta H^+ şi indică capacitatea de tamponare a sîngelui. Această noţiune subliniază importanţa altor tampoane alături de sistemul bicarbonat/acid carbonic. Bazele tampon pot scădea în anemii şi hipoproteinemii fără modificări apreciabile ale rezervei alcaline (bicarbonat actual).

Noţiunea de exces baze indică cantitatea de acizi sau baze (*mEq*) care ar putea restabili echilibrul acido-bazic într-un litru de sînge la P_{CO_2} de 40 *mm* Hg. Această valoare va fi negativă în acidoză şi pozitivă în alcaloză. Determinarea excesului de baze are o importanţă deosebită în terapia de corecţie a dezechilibrelor acido-bazice.

7.6. | Determinarea volumului sanguin

Variaţiile patologice ale volumului sanguin sînt de cele mai multe ori corelate cu tulburări ale metabolismului hidromineral.

Sîngele fiind o suspensie alcătuită din două faze, volumul sanguin este suma volumului elementelor figurate, care alcătuiesc faza solidă, şi a plasmei sanguine (faza lichidă). Procedeele existente permit fie determinarea volumului globular, fie al celui plasmatic. Determinîndu-le pe oricare dintre ele şi apoi valoarea hematocritului putem calcula volumul sanguin total.

Determinarea volumului sanguin prin metode indirecte, singurele utilizate în practica medicală, se bazează pe principiul diluţiei.

Scanned with OKEN Scanner

Fie o substanţă dată (un colorant sau o substanţă radioactivă), folosită la determinarea volumului sanguin, solvită în volumul v (ml). Cantitatea de substanţă C se poate scrie:

$$C = c_1 v \text{ unde } c_1 = \text{concentraţia}/ml \text{ a soluţiei.}$$

Diluînd substanţa cuprinsă în volumul v într-un volum mai mare V, cantitatea totală se păstrează neschimbată, ea scriindu-se în această nouă împrejurare:
$C = c_2 (v + V)$ unde c_2 este concentraţia/ml a soluţiei după diluare.
Egalînd expresiile pentru C în cele două cazuri rezultă:

$$c_2(V + v) = c_1 v_1$$

Dacă volumul v este neglijabil în raport cu V se poate considera că $V + v = V$ şi în acest caz ecuaţia precedentă devine:

$$V = \frac{c_1}{c_2} v$$

Cunoscînd deci concentraţia/ml c_1 şi volumul iniţial v precum şi concentraţia c_2 a amestecului realizat se poate calcula V în care a fost diluată substanţa.

Se folosesc diverse substanţe pentru determinarea volumului sanguin. Metodele bazate pe diluţia unor coloranţi tind să fie astăzi înlocuite prin metode care utilizează diluarea izotopilor radioactivi.

7.6.1. DETERMINAREA VOLUMULUI PLASMATIC CU ALBASTRU EVANS (T 1824)

Principiu: Metoda se bazează pe principiul diluţiei, aşa cum a fost expus. Se injectează intravenos o soluţie 0,5% albastru Evans (în aşa fel încît concentraţia de colorant să fie 0,3 *mg/kg* corp) care se fixează pe albuminele plasmatice cu care circulă în curentul sanguin. Gradul de diluţie al colorantului se determină fotometric comparativ cu un standard.

Reactivi. 1) Albastru Evans (T 1824), soluţie sterilă 0,5%. După dizolvarea colorantului, soluţia se filtrează steril şi poate fi păstrată mai mult timp. *2)* Anticoagulant. Soluţie de heparină comercială sau un amestec de 30 *mg* de oxalat de amoniu şi oxalat de potasiu în proporţie de 2/3.

Tehnica. 1) Prepararea soluţiei standard. Se recoltează cu o seringă de 10 *ml* aproximativ 10 *ml* sînge din vena cubitală. Sîngele recoltat se trece într-un tub de centrifugă pe anticoagulant şi se centrifughează 15 minute la 2000 rot/*min*. Se izolează plasma astfel separată.

Scanned with OKEN Scanner

Cu o seringă perfect calibrată se iau 5 *ml* soluţie albastru Evans 0,5% şi se diluează cu apă bidistilată în balon cotat la 250 *ml*. 3,6 *ml* plasmă obţinută, aşa cum am arătat, se amestecă cu 0,4 *ml* din soluţia de colorant diluat, obţinîndu-se astfel o diluţie de 500 ori a colorantului care constituie soluţia standard propriu-zisă.

2) Cu aceeaşi seringă cu care s-a preparat standardul se iau alţi 5 *ml* din soluţia 0,5% albastru Evans şi se injectează strict intravenos în vena cubitală a pacientului. După injectare se aspiră de 2—3 ori sînge în seringă şi se reinjectează în circulaţie.

3) După 10 minute de la injectare, din vena cubitală a braţului opus se recoltează 10 *ml* sînge pe anticoagulant. Sîngele recoltat se trece într-un tub de centrifugă şi se centrifughează 15—20 minute la 2000 rot/*min*. Plasma separată se aspiră şi se centrifughează din nou pentru a elimina elementele celulare care ar fi putut să rămînă în ea după prima centrifugare.

4) Se citesc extincţiile acestei plasme şi a standardului la 610 *nm* faţă de o probă în alb, reprezentată de plasma obţinută înainte de injectarea colorantului.

Calcul. Conform principiului diluţiei se utilizează formula:

$$\text{Vol. plasmatic } (ml) = \frac{E_{st} \times \text{diluţia st} \times \text{volumul soluţiei injectate}}{E \text{ probă}}$$

adică volumul plasmatic

$$(ml) = \frac{E \text{ st}}{E \text{ probă}} \times 2500$$

Observaţii. Pentru o mai precisă determinare se pot recolta trei sau mai multe probe de sînge din 10 în 10 minute. Probele de sînge sînt prelucrate în continuare conform indicaţiilor din metodă, citindu-se fiecare la fotometru comparativ cu standardul. Valorile extincţiilor obţinute se trec pe un sistem de reprezentare semilogaritmică (pe ordonată logaritmul extincţiei, iar pe abscisă timpul de recoltare). Se obţine astfel o dreaptă care, prin extrapolare, ne permite stabilirea valorii extincţiei pentru timp 0. Introducînd în formula de mai sus valoarea extincţiei pentru timpul 0, se poate calcula volumul plasmatic.

Precauţiuni. 1) Pacienţii cărora li se determină volumul sanguin, trebuie să nu mănînce şi să nu bea apă cel puţin 12 ore înainte de a li se face determinarea.

2) O plasmă lactescentă, cauzată de o hiperlipemie poate produce erori. Aceste erori sînt însă minimalizate dacă la prepararea standardului se foloseşte aceeaşi plasmă lipemică.

3) Injectarea colorantului trebuie făcută strict intravenos. Orice greşeală la injectare determină erori importante.

4) Seringa utilizată pentru standard trebuie utilizată şi pentru injectarea colorantului intravenos.

5) Timpul de recoltare trebuie strict respectat.

Scanned with OKEN Scanner

7.6.2. DETERMINAREA VOLUMULUI PLASMATIC CU ALBUMINĂ MARCATĂ CU I^{131} (RISA)

Principiu. Metoda se bazează pe principiul diluţiei izotopice întru totul asemănător principiului diluţiei descris mai sus, cu diferenţa că se exprimă concentraţia prin radioactivitatea soluţiei. Se lucrează cu serum-albumină marcată cu I^{131} care se amestecă rapid cu plasma sanguină şi care pe durata de timp în care se realizează amestecul cu sîngele nu migrează semnificativ în spaţiul extravascular.

Reactivi. 1. Albumină umană marcată cu I^{131} în soluţie de NaCl 0,9% sterilă, conţinînd alcool benzilic 0,9% şi 8—10 *mg/ml* albumină. Activitatea specifică 100 *Ci/g*. *2.* Soluţie de NaOH 20%. *3.* Soluţie saturată (la cald) de KI. *4.* Soluţie de NaCl 0,9% sterilă.

Tehnica. 1. Prepararea standardului: 10—15 μ*Ci* RISA, sterilă, se diluează în soluţie de NaCl 0,9% la un volum de 0,5—1 *ml*, după care se aspiră într-o seringă de 2 *ml*. Se trece apoi într-un balon cotat de 1000 *ml*, în care în prealabil s-au introdus 50 *ml* soluţie NaOH 20% şi o picătură soluţie saturată de KI. Se spală seringa de două ori cu apă bidistilată şi se introduce lichidul de spălare în balon după care se completează la marcă cu apă bidistilată.

2. 10—15 μ*Ci* de RISA (întotdeauna aceeaşi cantitate ca şi pentru soluţia standard) sterilă se diluează în NaCl 0,9% sterilă la un volum de 0,5—1 *ml* (este indicat ca întotdeauna să se utilizeze acelaşi volum ca şi în cazul standardului). Se aspiră într-o seringă sterilă de 2 *ml* după care se administrează strict intravenos în vena cubitală. Se aspiră apoi sînge de 1—2 ori în seringă şi se reinjectează.

3. După 10 minute de la injectare se recoltează din vena cubitală a braţului opus 5—10 *ml* sînge, cu o seringă heparinizată, şi se introduce sîngele într-un tub de centrifugă pe anticoagulant (1—2 picături de soluţie de heparină comercială).

4. Din sîngele recoltat se ia o probă pentru determinarea hematocritului.

5. Restul de sînge se centrifughează 15 minute la 3000 rot/*min.* şi din plasma separată se pipetează cîte un *ml* în două eprubete pentru măsurători.

6. Din soluţia standard se pipetează cîte un *ml* în două eprubete pentru măsurători.

7. Radioactivitatea probelor de plasmă şi a celor standard se măsoară cu un cristal de scintilaţie cu puţ, de iodură de potasiu, activată cu taliu şi cuplat la un numărător de particule.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul. Rezultatele se exprimă în număr de impulsuri/*min./ml.* Volumul plasmatic se calculează după formula:

$$\text{Vol. plasmatic } (ml) = \frac{\text{nr. impulsuri/}min/ml \text{ standard} \times \text{diluția standard}}{\text{nr.impulsuri/}min/ml \text{ plasma obținută după centrifugare}}$$

Exemplu: activitatea probei standard — fond = 17.940 imp/*min/ml.*
Radioactivitatea probei de plasmă — fond = 5750 imp/*min/ml.*

$$\text{Vol. plasmatic } (ml) = \frac{17.940 \times 1000}{5750} = 3.120 \; ml.$$

Cunoscînd volumul plasmatic și determinînd hematocritul, a cărui corecție o facem înmulțindu-l cu 0,96 pentru hematocritul venos și apoi cu 0,91 pentru hematocritul somatic, putem determina volumul sanguin total după formula:

$$\text{Volum sanguin total } (ml) = \frac{\text{Volumul, plasmatic} \times 100}{100 - \text{hematocritul corectat}}$$

Exemplu: volumul plasmatic = 3120 *ml*
Hematocritul corectat = 39,4%

$$\text{Volumul sanguin total} = \frac{3120 \times 100}{100 - 39,4} = 5165 \; ml.$$

În continuare se poate determina volumul eritrocitelor după formula:

Volumul eritrocitar = volum sanguin total — volum plasmatic.

Exemplu: volum sanguin total = 5165 *ml*
Volumul plasmatic = 3120 *ml*
Volumul eritrocitar = 5165 — 3120 = 2045 *ml.*

Observații. 1. Deoarece în cursul fazei de omogenizare și după ea, are loc totuși o anumită migrare a serumalbuminei marcate în spațiul extravascular, pentru o mai mare precizie, se vor face cel puțin trei recoltări a cîte 5—10 *ml* sînge fiecare, la 10, 20 și 30 minute după injectare. Valorile obținute se trec pe un sistem semilogaritmic, pe ordonată logaritmul radioactivității probelor (număr de impulsuri), iar pe abscisă se trece timpul. Se obține o dreaptă care exprimă scăderea radioactivității. Prin extrapolare la timpul zero obținem numărul de impulsuri/*ml* plasmă și per minut, adică numărul de impulsuri la terminarea injectării (presupunînd că în acel moment, soluția de RISA s-a omogenizat perfect în sînge). Cu ajutorul acestei valori teoretice se poate calcula volumul sanguin.

Exemplu. Radioactivitatea plasmei la 10 minute de la recoltare — fond = 575 imp/*min/ml.*
Radioactivitatea plasmei la 20 min. de la recoltare — fond = 530 imp/*min/ml.*
Activitatea plasmei la 30 min. de la recoltare — fond = 505 imp/*min/ml.*

Scanned with OKEN Scanner

Extrapolarea pe grafic semilogaritmic la timpul zero ne dă o radioactivitate egală cu 6100 imp/*min*/*ml*. De unde volumul plasmatic se poate calcula astfel:

$$\text{Volum plasmatic} = \frac{17.940.000}{6100} = 2940 \; ml.$$

17.940.000 = valoarea standardului × 1000

2. Mulţi autori utilizează pentru determinarea volumului plasmatic serumalbumina marcată cu I^{125} cu tehnica descrisă mai sus. Avantajul metodei constă în precizia mai mare de măsurare datorită utilizării unei aparaturi mai sensibile şi o doză mai mică de administrare (5 μCi).

În condiţiile în care se impune o determinare dinamică a volemiei se poate utiliza o aparatură semiautomată la care volumul sanguin se citeşte direct în litri.

Precauţii. 1. Se recomandă folosirea de soluţie RISA proaspătă (să nu depăşească 14 zile).

2. Injectarea soluţiei de RISA trebuie făcută strict intravenos. Orice cantitate de RISA care nu ajunge direct în torentul sanguin alterează grav rezultatele.

3. Evitarea stazei excesive la recoltarea sîngelui.

4. Evitarea contaminării sticlăriei şi aparaturii de lucru.

5. Respectarea strictă a timpului de recoltare a sîngelui.

6. Pipetările trebuie făcute cu cea mai mare precizie.

7.6.3. | DETERMINAREA VOLUMULUI ERITROCITAR CU CR^{51}

Principiu. Metoda se bazează pe principiul diluţiei izotopice. Se utilizează eritrocite marcate cu Cr^{51} in vitro. Cromul pătrunde sub formă de ioni $^{51}CrO_4$ hexavalent prin membrana celulară în eritrocit unde este fixat ireversibil pe fracţiunea globinică a hemoglobinei sub formă de Cr trivalent. În condiţii fiziologice, eritrocitele nu pot străbate membrana capilară şi astfel prin marcarea lor avem posibilitatea determinării precise a volumului sanguin.

Reactivi. 1. $Na_2Cr^{51}O_4$ în soluţie de NaCl 0,9% sterilă 0,150—0,645 *mg* Cr/*ml*, cu activitate specifică de 40—70 *Ci*/*g*. 2. Soluţie anticoagulantă A.C.D.: 8 *mg* acid citric, 25 *mg* citrat de sodiu, 12 *mg* dextroză, totul ad 10 *ml* apă bidistilată. 3. Soluţie sterilă de NaCl 0,9%.

Tehnica. 1. Marcarea eritrocitelor. Din vena cubitală se recoltează în condiţii de minimă hemostază 10—20 *ml* sînge cu o seringă sterilă spălată în prealabil cu soluţie A.C.D.

Sîngele se introduce într-un tub de centrifugă de 25 *ml*, steril şi închis etanş cu un dop de cauciuc, în care se găseşte soluţie A.C.D. Raportul între sînge şi A.C.D. trebuie să fie de 4/1.

Scanned with OKEN Scanner

Se efectuează centrifugarea sîngelui 15 *min.* la 2000 rot/*min.* Plasma separată se scoate cu o seringă sterilă și peste sedimentul de eritrocite se adaugă în condiții de sterilitate soluție de NaCl 0,9% sterilă, în volum egal cu cantitatea de plasmă scoasă. Se centrifughează 15 minute la 2000 rot/min. După centrifugare supernatantul se scoate și peste sedimentul de eritrocite se adaugă din nou soluție sterilă de NaCl 0,9% la care în prealabil s-a adăugat 50 μCi soluție sterilă de $NaCr^{51}O_4$ (totul în volum egal cu cel al plasmei transvazate). Soluția de eritrocite astfel preparată se pune la termostat la 37°C timp de 30 de minute. Din cînd în cînd soluția se agită ușor.

După 30 de minute soluția de eritrocite se scoate de la termostat și se centrifughează 15 minute la 2000 rot/*min.* Se scoate supernatantul și se adaugă din nou soluție sterilă de NaCl 0,9% în volum egal cu cea scoasă. Centrifugăm 15 minute la 2000 rot/*min.* În cazul bolnavilor cu o fragilitate patologică a eritrocitelor se recomandă a nu se executa decît o singură spălare. În mod normal se fac 2—3 spălări. După ultima spălare supernatantul se scoate și peste sedimentul de eritrocite marcate se introduce soluție sterilă de NaCl 0,9% în așa fel încît volumul final al suspensiei de eritrocite să fie de 15 *ml.* Soluția se agită ușor.

2. Prepararea standardului: din suspensia de eritrocite după agitare se scoate un *ml* care se diluează în balon cotat cu soluție sterilă de NaCl 0,9% la 10 *ml.*

3. Cu o seringă sterilă de 10 *ml* se scot din suspensia de eritrocite marcate 10 *ml* care se injectează în vena cubitală.

4. După injectare la 10—15 minute se recoltează din vena cubitală a brațului opus fără stază 5—10 *ml* sînge. Din sîngele recoltat se ia o probă pentru determinarea hematocritului.

5. Restul de sînge recoltat se centrifughează 15 minute la 3000 rot/*min.* Supernatantul se scoate și din suspensia de eritrocite rămase se pipetează cîte un *ml* în două eprubete pentru măsurători.

6. Din soluția standard se pipetează cîte un *ml* în două eprubete de măsurători.

7. Radioactivitatea probelor de eritrocite și a celor standard se măsoară cu un cristal de scintilație de iodură de sodiu activată cu taliu, cu puț, cuplat la un numărător de particule.

Calcul. Rezultatele se exprimă în număr de impulsuri/*min*/*ml.*

Determinarea volumului eritrocitelor se face după formula:

$$\text{Vol. eritrocitelor } (ml) = \frac{\text{nr. impulsuri}/min./ml. \text{ standard} \times \text{diluția standard} \times \text{nr. } ml. \text{ suspensie eritroc. admin.}}{\text{nr. imp.}/min./ml. \text{ eritrocite sînge recoltat}}$$

Scanned with OKEN Scanner

Exemplu:
Radioactivitatea probei standard — fond = 6000 imp/min./ml.
Diluţia standardului = 10
ml eritrocite injectate = 10
Radioactivitatea probei (eritrocite) recoltată — fond =
= 293 imp/*min*/*ml*.
Hemocritul corectat = 41%

$$\text{Volumul eritrocitar} = \frac{6000 \times 10 \times 10}{293} = 2050\ ml.$$

Cunoscînd volumul eritrocitar putem calcula volumul sanguin total după formula:

$$\text{Volum sanguin total } (ml) = \frac{\text{Volum eritrocitar} \times 100}{\text{hematocritul corectat}}.$$

Exemplu:
Volumul eritrocitar = 2050 *ml*.
Hematocritul corectat = 41%.

$$\text{Volum sanguin total} = \frac{2050 \times 100}{41} = 5000\ ml.$$

Cunoscînd volumul sanguin total şi volumul eritrocitar putem determina volumul plasmatic după formula:
Volum plasmatic = volum sanguin total — volum eritrocitar.

Observaţii. Autori ca H. U. Pixberg, B. Gheorghescu şi alţii adaugă sîngelui integral soluţia de Cr^{51} peste care adaugă 50 *mg* acid ascorbic. Acesta acţionînd ca un reducător transformă cromul hexavalent din plasmă care nu a fost fixat de eritrocite în crom trivalent, formă sub care nu mai poate fi fixat pe globina hemoglobinei eritrocitare. În continuare metoda se aseamănă cu cea descrisă mai sus.

2. Metoda cea mai precisă de stabilire a volumului sanguin total este aceea în care se face determinarea simultană a volumului plasmatic cu albumină marcată cu I^{125} şi a volumului eritrocitar cu eritrocite marcate cu Cr^{51}. Instalaţia de măsurare impune în acest caz prezenţa unui numărător de impulsuri care să funcţioneze şi ca discriminator de energie. Această metodă evită erorile care se datoresc determinării volumului sanguin cu ajutorul hematocritului.

Precauţii. 1. Respectarea strictă a condiţiilor de temperatură (37°C), a timpului de incubare (30 minute) şi utilizarea soluţiei A.C.D. ca anticoagulant, asigură un randament de marcare al eritrocitelor de 90%. Abaterile de la aceşti parametri reduc randamentul marcării.

2. Injectarea strict intravenoasă a eritrocitelor marcate.

3. Injectările şi recoltările să se facă fără stază sau cu o stază foarte uşoară.

Scanned with OKEN Scanner

4. Recoltarea probelor de sînge se face numai din braţul opus celui în care s-a făcut injectarea.

5. Evitarea contaminării sticlăriei.

7.6.4. INTERPRETAREA REZULTATELOR LA DETERMINĂRILE DE VOLUM SANGUIN

Valori normale: volum sanguin total = 60 — 72 *ml/kg* corp.
volum eritrocitar = 30 *ml/kg* corp.
volum plasmatic = 40 — 46 *ml/kg* corp.

La sportivi şi persoane antrenate, valorile pot fi crescute cu peste 10%. La obezi şi bolnavi în repaus total, valorile sînt scăzute cu 10%.

Pentru un subiect dat, valorile teoretice ale volumului sanguin se pot determina cu ajutorul nomogramei de la figura nr. 44 în funcţie de înălţimea şi greutatea corpului.

2. Variaţiile volumului sanguin. Rowntree clasifică stările volemice în funcţie de valoarea volumului sanguin şi a hematocritului aşa cum rezultă din tabelul de mai jos.

Volum sanguin		*Hematocrit*	*Exemple*
Normal (Normovolemie)	simplă	normal	în condiţii fiziologice
	oligocitemică	scăzut	în anemii
	policitemică	crescut	în expunere la hipoxie timp îndelungat
Scăzut (Hipovolemie)	simplă	normal	în primele minute după hemoragie
	oligocitemică	scăzut	într-o fază ulterioară a hemoragiei
	policitemică	crescut	stări de şoc
Crescut (Hipervolemie)	simplă	normal	sportivi antrenaţi
	oligocitemică	scăzut	în graviditate
	policitemică	crescut	poliglobulii primare şi secundare.

BIBLIOGRAFIE

1. Albert, N. S., *Nuclear medicine* (W. H. Bland), ed. Mc Graw Hill Blook, 1965, p. 536. 2. Alteraş, I., Cajal, N., Cojocaru, I., Comoroşan, S., Dăncescu, P., Ieremia, T., Kondi, V., Mitrică Natalia., *Manual de laborator clinic*, Ed. medicală, Bucureşti, 1962. 3. Baciu, I., *Fiziologie*, Ed. didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1970. 4. Bernát, I., *A vasanyagcsere*, Ed. Medicina, Budapesta, 1973. 5. Fischer, J., Wolff, R., *Nuclear medicine in hematology*, Edit. Mainz, 1968. 6. Gheorghescu, B., Braslă, I., *Diagnos-*

Scanned with OKEN Scanner

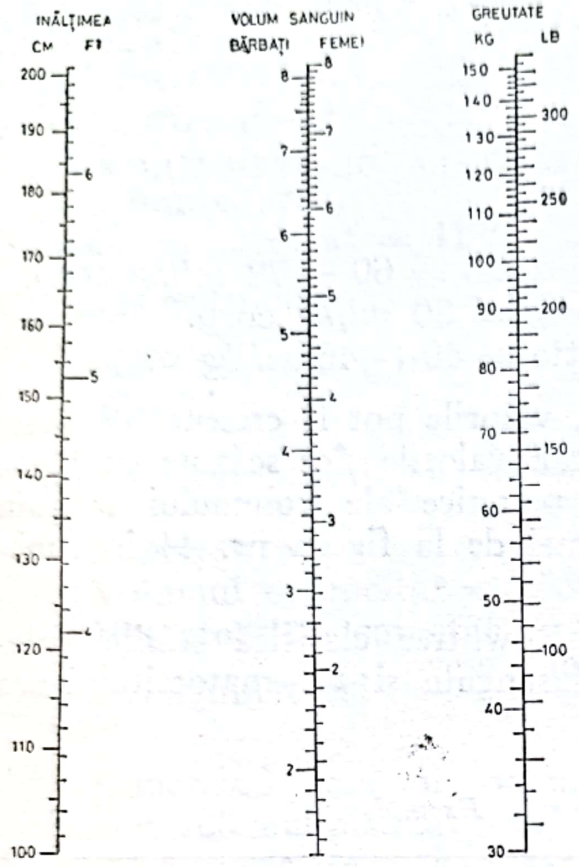


Fig. 44. Normogramă pentru calculul volumului sanguin pe baza greutății corporale și a înălțimii.

ticul cu radioizoptopi în clinică. Ed. medicală, București. 1964. 7. Hobbs, J. T., *Total blood volume — its measurement and significance.* Monograph. Ed. by The Radiochemical Centre, Amersham, England, 1968, 8. Szirmay, E., *Nuclear hematology,* Academic Press, 1965.

7.7. | Fierul și cuprul seric

Metabolismul fierului și cuprului sînt în strînsă legătură. Ambele metale contribuie la sinteza hemoglobinei și la formarea unor sisteme enzimatice cu rol în procesele de oxido-reducere. Atît fierul cît și cuprul se găsesc în plasmă legate de proteine. Proteina transportoare de fier este siderofilina sau transferina (o betaglobulină). Ionii liberi de fier apar în plasmă doar în caz de administrări excesive de săruri de fier, cînd se depășește capacitatea de fixare a siderofilinei.

Cuprul seric se prezintă sub două forme distincte. O mică fracțiune (aproximativ 4%) este legată în mod labil de albumină și reprezintă forma de transport. Restul cuprului se găsește fixat pe o $alfa_2$-globulină — ceruloplasmina. Această proteină acționează in vitro ca o polifenol-oxidază (vezi pag. 330) iar in vivo favorizează oxidarea fierului din formă bivalentă în formă trivalentă facilitînd fixarea ionilor de fier pe transferină.

7.7.1. | FIERUL SERIC

Dozarea fierului se poate face prin spectrofotometrie de absorbție atomică (metoda preferată, datorită specificității și sensibilității) sau prin metode chimice.

Metodele chimice de dozare a fierului parcurg următoarele faze: *1*) Scindarea fierului de pe transferină (siderofilină) cu ajutorul unui acid (concomitent se face și deproteinizarea), în care caz există pericolul eliberării incomplete sau a deproteinizării incomplete sau de preferință cu ajutorul unui detergent specific Teepol R.

Scanned with OKEN Scanner

2) Transformarea fierului trivalent în fier bivalent cu reducători: hidrochinonă, hidrazină, sulfit, acid ascorbic, tioglicolat, hidroxilamină, ditionit.

3) Transformarea într-un complex colorat cu diferiţi agenţi: fenantrolină, dipiridină (care au coeficienţi molari de extincţie relativ scăzuţi) sau de preferinţă batofenantrolina. Aceasta are un coeficient de extincţie mare (22.100) şi în plus o mare specificitate pentru fier.

7.7.1.1. DOZAREA FIERULUI SERIC (METODA HEILMEYER MODIFICATĂ)

Principiu. Fierul seric este eliberat sub acţiunea acidului clorhidric sub formă de ioni de Fe^{3+}. Serul este deproteinizat cu acid tricloracetic, iar ionii Fe^{3+} sînt reduşi la Fe^{2+} de către hidrochinonă. Ionii de Fe^{+2} formează cu ortofenantrolina, un complex de culoare roz-roşie, foarte stabil. Coloraţia este proporţională cu concentraţia fierului.

Reactivi. 1. Soluţie HCl 1N (HCl pro anal.). *2.* Soluţie CCl_3COOH 20% (CCl_3COOH p.a.). *3.* Soluţie hidrochinonă 2% (purissim). *4.* Soluţie ortofenantrolină clorhidrică 1% (se poate utiliza şi ortofenantrolină, iar pentru dizolvare se acidulează cu 2—3 picături de HCl concentrat p.a.) *5.* Soluţie semisaturată de CH_3COONa. Se diluează extemporaneu o soluţie saturată (la temperatura camerei cu apă bidistilată) în proporţie de 1 :1. *6.* Soluţie standard concentrată de fier 10 *mg*%: 0,0497 *g* $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ad 100 *ml* apă bidistilată sau 0,0702 *g* $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ad 100 *ml* apă bidistilată. Standardul concentrat se păstrează la frigider. Se diluează extemporaneu 1 *ml* la 100 *ml* apă bidistilată obţinîndu-se un standard de lucru de 100 μg% Fe cu stabilitate limitată.

Tehnica. 2 *ml* ser nehemolizat, 1 *ml* soluţie HCl 1N se agită puternic şi se lasă 10 minute în repaus. Se adaugă 2 *ml* CCl_3COOH 20%, se agită, se lasă 10 minute în repaus, după care se centrifughează la 3500—4000 rot/*min.* Concomitent se face o *probă în alb* cu 2 *ml* apă bidistilată, 1 *ml* soluţie HCl 1N, 2 *ml* soluţie CCl_3COOH 20% şi un *standard* cu 2 *ml* soluţie standard Fe de 100 μg%, 1 *ml* soluţie HCl 1N şi 2 *ml* soluţie CCl_3COOH 20%. După centrifugarea probei se scot din proba în alb, probă şi standard, 2 *ml* supernatant la care se adaugă 0,2 *ml* soluţie hidrochinonă 2%, 0,1 *ml* soluţie o-fenantrolină 1%, 2 *ml* soluţie semisaturată de CH_3COONa. Se agită şi după 5 minute se fotometrează proba şi standardul în cuve de 1 *cm* la 510 *nm* faţă de proba în alb.

$$\text{Calcul Fe } \mu g\% = \frac{E \text{ probă} \times 100}{E \text{ standard}}$$

Scanned with OKEN Scanner

Observaţii. 1. Metoda permite decelarea a minimum 10 µg Fe/100 *ml* ser. *2.* Pentru obţinerea de rezultate exacte este necesară respectarea riguroasă atît a tehnicii de lucru, cît şi a recoltării probelor şi anume recoltarea se va face prin puncţie venoasă fără stază, sîngele scurgîndu-se direct prin ac în eprubeta de centrifugă. *3.* Sticlăria utilizată la determinări de Fe va fi spălată cu amestec sulfocromic, apoi cu apă şi cu apă bidistilată astfel încît să se asigure îndepărtarea oricăror urme de fier. *4.* Se obţin rezultate reproductibile şi prin folosirea de cantităţi reduse de ser (0,5 *ml*).

Valori normale: Bărbaţi: 90—140 µg%
Femei: 80—120 µg%.

BIBLIOGRAFIE

Gitter, A., Heilmeyer, L., *Manual de probe funcţionale clinice*, Ed. medicală, Bucureşti, 1961.

7.7.1.2. DOZAREA PRIN METODA SANFORD. MODIFICATĂ DE LAUBER

Determinarea este foarte rapidă, fiindcă reacţia se efectuează direct în cuva fotometrului, ceea ce reduce la minim contaminările şi permite efectuarea a 30 determinări pe oră. În plus detergentul Teepol R nu eliberează deloc fierul din hemoglobină, cum se întîmplă în cazul folosirii acizilor.

Principiu. Fierul trivalent este pus în libertate din transferină cu ajutorul detergentului Teepol R, este redus cu ditionit la fier bivalent, apoi complexat cu batofenantrolin-sulfonat, iar extincţia complexului se citeşte la 546 *nm.*

Reactivi. 1) Reactivul Teepol: se dizolvă 5 g ditionit de Na în 100 *ml* soluţie sulfat de magneziu 1% (10 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$/1000 *ml*) şi se amestecă imediat cu 100 *ml* Teepol 710 R (Roche-Bâle Elveţia). Se adaugă imediat 50 *ml* sol. NaOH 3% (30 g NaOH/1000 *ml* apă bidistilată); se lasă amestecul tulbure 10—15 *min*, apoi se centrifughează. Impurităţile de fier trec în sediment ca $Fe(OH)_2$ cu precipitatul de $Mg(OH)_2$. Supernatantul este decantat şi *pH*-ul este ajustat cu acid acetic glacial la 5,4—6,2. Se pune în recipiente din plastic, care se umplu complet, se închid bine şi se păstrează la +4°C (în aceste condiţii se păstrează cel puţin 2 luni). Se vor lua doar cantităţile necesare zilnic, ştiind că prin expunere în aer, îşi pierde puterea reducătoare.

2) Soluţie de batofenantrolin-sulfonat disodic: se dizolvă 1 g în 100 *ml* apă bidistilată. Se poate prepara sulfonatul în felul următor:

Scanned with OKEN Scanner

într-un tub conic de centrifugă se introduc 100 *mg* batofenantrolină, apoi 0,5 *ml* acid clorosulfonic prelevat cu precauţie (este iritant şi caustic!). Se fierbe pe flacără 30 *sec.*, se răceşte, apoi se adaugă 10 *ml* apă bidistilată cu mare grijă, pentru a evita proiectarea soluţiei din eprubetă. Apa se introduce cu o pipetă Pasteur, pe pereţi, agitînd după fiecare adăugare. După primii 3—4 *ml* adăugarea poate fi mai rapidă. Precipitatul care se formează se dizolvă prin încălzire uşoară pe baie de apă. Reactivul este stabil dacă se păstrează la +4°C.

3) Soluţie standard Fe, 100 µg/100 *ml*: se dizolvă 50 *mg* Fe pur într-un amestec de 1 *ml* acid azotic conc. şi HCl şi se diluează la 500 *ml* cu apă. 1 *ml* din această soluţie de bază, se diluează la 100 *ml* cu apă bidistilată. Stabilă nelimitat în stare congelată, în vas de sticlă.

Se mai poate prepara şi astfel: Sare Mohr ($FeSO_4$). $(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$, 0,175 *g*, HCl 6 *N*, 0,5 *ml*, apă distilată ad 250 *ml*. 1 ml din soluţia de bază se diluează la 100 ml cu apă bidistilată.

Tehnica. Analiza se face direct în cuva de 1 *cm*, la 546 *nm*, în ordinea: probă în alb, standard şi probă.

Reactivi	*Probă în alb*	*Standard*	*Probă*
Apă bidistilată (*ml*)	0,2	—	—
Reactiv Teepol (*ml*)	0,5	—	—
Se amestecă bine şi se reglează extincţia la zero.			
Batofenantrolin sulfonat (*ml*)	0,01	—	—
Se amestecă bine şi se citeşte extincţia (E_A).			
Standard (*ml*)	—	0,2	—
R. Teepol (*ml*)	—	0,5	—
Se amestecă bine şi se reglează extincţia la zero.			
Batofenantrolin sulfonat (*ml*)	—	0,01	—
Se amestecă bine şi se citeşte extincţia (E_S).			
Plasmă (*ml*)	—	—	0,2
Reactivi	*Probă în alb*	*Standard*	*Probă*
R. Teepol (*ml*)	—	—	0,5
Se amestecă bine şi se reglează extincţia la zero.			
Batofenantrolin sulfonat	—	—	0,01
Se amestecă bine şi se citeşte extincţia (E_p).			

Nu este necesar să se aştepte după adăugarea reactivului de batofenantrolină, fiindcă maximul extincţiei se atinge imediat.

Calcul. $\frac{E_P - E_A}{E_S - E_A} \cdot 100 = \mu g$ Fe/100 *ml*.

Scanned with OKEN Scanner

Observaţii. 1) Serul şi plasma se pot păstra pînă la patru zile la temperatura camerei şi 6 zile la +4°C. *2*) La o serie de determinări se vor face o singură probă în alb şi un standard. *3*) Hemoliza interferează doar la concentraţii de peste 500 *mg* Hb/100 *ml*, iar bilirubina nu interferează. În cazul serurilor lipemice se amestecă 0,1 *ml* plasmă cu 0,5 *ml* reactiv Teepol şi se aşteaptă 15 *min.*, timp în care se clarifică plasma. Apoi se aplică tehnica de mai sus. *4*) Legea Lambert-Beer este valabilă pînă la concentraţia de 1000 µg/100 *ml*. Dacă reactivii sînt preparaţi corect, extincţia probei în alb este sub 0,005. *5*) Se pot mări volumele reactivilor în mod proporţional de 2—2,5 ori. *6*) Această metodă este utilă în special pentru detectarea concentraţiilor scăzute ale fierului seric care pot fi astfel apreciate cu multă precizie.

Valorile normale sînt arătate la metoda Heilmeyer, fiind aceleaşi.

BIBLIOGRAFIE

1. Sanford, R., J. Clin. Path., 1963, *16*, 174. 2. Lauber, K., Zeitschr. Klin. Chem., 1965, *3*, 96. 3. Richterich, R., *Chimie clinique, théorique et pratique*, Doin. Paris, 1966.

7.7.2. | CAPACITATEA DE LEGARE A FIERULUI

Se disting următoarele noţiuni:

Capacitatea totală de legare a fierului, care corespunde cantităţii totale de transferină (siderofilină) din plasmă, exprimată în µg Fe care pot fi legate de transferina din 100 *ml* plasmă (µg Fe/100 *ml*). Se mai numeşte IBC ("iron binding capacity") sau TIBC ("total iron binding capacity").

Capacitatea latentă de legare a fierului este cantitatea de transferină care nu este saturată cu Fe. Se notează UIBC ("unsaturated iron binding capacity"). Se exprimă în µg Fe/100 *ml* care pot fi adsorbiţi de transferina nesaturată.

Saturarea transferinei în procente este cantitatea de transferină saturată (în µg Fe/100 *ml*) în procente din capacitatea totală de legare a Fe (de asemenea exprimată în µg Fe/100 *ml*):

$$\text{Saturarea în procente} = \frac{\text{capacitatea latentă de legare a fierului. 100}}{\text{capacitatea totală de legare a fierului.}}$$

După alţi autori se defineşte:

$$\text{Coeficientul de saturare al transferinei} = \frac{\text{Fe seric}}{\text{capacitatea totală de legare}}$$

Din capacitatea totală de legare se poate calcula concentraţia transferinei, ştiind că greutatea moleculară a acesteia este 89.000 şi că

Scanned with OKEN Scanner

fiecare moleculă transportă 2 atomi de fier (deci, 2 × 55,85 g la 89.000 g):

TIBC (*µg*/100 *ml*) × 0,8 = transferină (*mg*/100 *ml*).

Valori normale

Capacitatea totală de legare a fierului: 250—420 µg/100 *ml*
Siderofilină (exprimată ca proteină) = 200—340 *mg*/100 *ml*
Capacitatea latentă de legare a fierului: 130—420 µg/100 *ml*
Saturarea în procente: 20—55%

S-au elaborat diverse metode de determinare a capacităţii de fixare a fierului. Dintre acestea vom descrie metoda Ramsay care este simplu de efectuat şi suficient de precisă.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

7.7.2.1. DETERMINAREA CAPACITĂŢII TOTALE DE FIXARE A FIERULUI (METODA RAMSAY)

Principiu. Pentru dozarea capacităţii totale de fixare a fierului se adaugă Fe^{3+}, în exces, serului de analizat; excesul de fier nefixat pe siderofilină este îndepărtat prin adăugare de carbonat de magneziu anhidru. Fierul legat de siderofilină este dozat prin metode de dozare a fierului seric.

Reactivi. 1) Soluţia clorură ferică conţinînd 1000 µg Fe^{+++} la 100 *ml* HCl 0,005 *N*. Se dizolvă 0,00484 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ în 80 *ml* HCl 0,005 *N* şi se aduce volumul la 100 *ml* cu HCl 0,005 *N*. 2) $MgCO_3$ anhidru p.a. *3*) Reactivii pentru dozarea fierului seric prin metoda Heilmeyer modificată.

Tehnica. La *2 ml* ser se adaugă 2 *ml* soluţie $FeCl_3$, (reactiv 1) se agită bine şi se lasă în repaus 10 minute, se adaugă apoi 200 *mg* $MgCO_3$ şi se agită din cînd în cînd, timp de 60 de minute. Se centrifughează la 3000 rot/*min.*, timp de 5 minute. Se scot 2 *ml* supernatant în care se dozează fierul seric. Concomitent se face o probă în alb şi un standard (vezi pag. 275) conform schemei de mai jos:

Reactivii	*Prob în alb*	*Standard*	*Probă*
Apă bidistilată (*ml*)	2	—	—
Sol. standard (*ml*)	—	2	—
Supernatant (*ml*)	—	—	2
Sol. HCl 1N (*ml*)	1	1	1
Se lasă în repaus 10 minute			
Acid tricloracetic 20% (*ml*)	2	2	2
Se lasă în repaus 10 minute după care se centrifughează, apoi se iau			

Scanned with OKEN Scanner

Reactivii	*Probă în alb*	*Standard*	*Probă*
Supernatant (*ml*)	2	2	2
Sol. hidrochinonă 2% (*ml*)	0,2	0,2	0,2
Sol.o.fenantrolină 1% (*ml*)	0,1	0,1	0,1
Sol. semisaturatic acetat de sodiu (*ml*)	2	2	2
Se agită			

După cinci minute se citesc extincţiile probei şi standardului, faţă de proba în alb, la 510 *nm*, în cuva de 1 *cm*.

Calcul. Capacitatea totală de fixare a Fe $\mu g\% =$

$$= \frac{E \text{ probă} \times 2 \times 100}{E \text{ standard}}$$

Valori normale a capacităţii totale de legare a ferului: 250—420 $\mu g/100$ *ml*.

BIBLIOGRAFIE

Ramsay, W. N. M., Clin. Chim. Acta, *2*, (1957), p. 221.

7.7.3. | CUPRUL SERIC

Dintre metodele de determinare a cuprului seric, cea mai adecvată este determinarea prin spectroscopie de absorbţie atomică. Dintre metodele chimice se folosesc determinările cu reactivii de culoare specifici pentru cupru: batocuproina sau dietil ditiocarbamatul de sodiu.

7.7.3.1. | METODA CU BATOCUPROINĂ

Principiu. Cuprul este legat de proteinele serice cu ajutorul unei soluţii acide de hidrochinonă se pune în libertate cuprul sub formă redusă (Cu^+). Acesta împreună cu reactivul de culoare (batocuproina sulfonată) formează un complex care se determină fotometric.

Reactivi. 1) Soluţie reducătoare (acid clorhidric 1 *N*, hidrochinonă $9 \cdot 10^{-2}$ *M*): se dizolvă 9,9 *g* hidrochinonă în 1000 *ml* acid clorhidric 1 *n*. *2*) Acid tricloracetic, soluţie 20%. *3*) Reactiv de culoare (acid batocuproindisulfonic, forma disodică $8{,}9 \cdot 10^{-4}$ *M*, acetat de Na 3 *M*: se dizolvă 0,5024 *g* batocuproindisulfonat şi 408,24 *g* acetat de Na ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) în 1000 *ml* apă bidistilată. *4*) Soluţie standard concentrată de cupru: se dizolvă 100 *mg* cupru metalic pur în 5 *ml* H_2SO_4 şi se diluează la 1000 *ml* cu apă bidistilată. Soluţia standard diluată se face luînd 2 *ml* din soluţia concentrată şi adăugînd apă bidistilată ad 50 *ml*, apoi se adaugă o picătură acid sulfuric conc.

Scanned with OKEN Scanner

şi în continuare apă bidistilată ad 100 *ml*. Soluţia diluată conţine 200 µg cupru/100 *ml*.

Toţi reactivii sînt stabili timp de un an la temperatura camerei.

Tehnica. Se pregătesc trei tuburi de centrifugă.

Reactivi	*Probă*	*Standard*	*Probă în alb*
Ser (*ml*)	1,0	—	—
Sol. reducătoare (*ml*)	1,0	1,0	1,0
Sol. standard diluată (*ml*)	—	1,0	—
Apă bidistilată (*ml*)	—	—	1,0

Se amestecă, se lasă 10 minute la temperatura camerei, apoi se adaugă:

Acid tricloracetic 20% (*ml*)	1,0	1,0	1,0

Se amestecă, apoi proba se centrifughează. Din soluţiile clare se pipetează în eprubete curate şi uscate:

Supernatant (în cazul probei) sau din eprubetele de centrifugă pt. standard şi probă în alb (*ml*)	2,0	2,0	2,0
Reactiv de culoare (*ml*)	0,5	0,5	0,5

Se agită puternic, apoi se citeşte extincţia probei şi a standardului faţă de proba în alb, la 480 *nm*, în cuvă de 1 *cm*.

Calcul.

$$\mu g \text{ Cu}/100 \text{ } ml \text{ ser} = \frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \cdot 200$$

Valori normale: bărbaţi: 70—140 µg/100 *ml*; femei: 85—155 µg/100 *ml*. La copii între 5—17 ani s-au raportat valori mai mari: 164 µg/100 *ml*.

Observaţii. 1) Sticlăria utilizată trebuie să fie păstrată peste noapte în amestec sulfocromic, apoi spălată bine cu apă şi apă bidistilată. *2*) Se poate lucra reducînd volumele tuturor reactivilor de patru ori. *3*) Din supernatantul de la centrifugare se poate doza fierul seric, făcînd astfel o economie de material biologic. *4*) Un standard de Cu se poate prepara şi astfel: 0,3928 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ în 100 *ml* apă bidistilată. Un *ml* din această soluţie se diluează la 500 *ml* cu apă bidistilată, obţinîndu-se o concentraţie de 200 µg Cu/100 *ml*.

BIBLIOGRAFIE

1) Zak, B., Clin. Chem. Acta, 1958, *3*, 328. *2*) O'Brien, D., Ibbott, A. F., *Laboratory Manual of Pediatric Micro- and Ultramicro-Biochemical Techniques*, ed. 3, Harper & Bow, New-York, 1962. *3*) Henry, R. J., *Clinical Chemistry. Principles and Techniques*, Hoeber Medical Division, 1964, S 408.

Scanned with OKEN Scanner

Principiu. Cuprul eliberat de pe proteinele plasmatice formează cu dietilditiocarbamatul un complex colorat galben care se extrage în alcool amilic, măsurîndu-se apoi extincția la 430 *nm.*

Reactivi. 1) Acid tricloracetic 20%. *2*) Soluție pirofosfat de sodiu 4%. *3*) Amoniac concentrat. *4*) Alcool amilic. *5*) Soluție dietilditiocarbamat de sodiu, 2%. *6*) Apă bidistilată. *7*) Soluție standard de cupru preparată așa cum s-a arătat în metoda precedentă.

Tehnica. Într-un flacon Erlenmayer de 25 *ml* se diluează 2 *ml* ser cu 6 *ml* apă bidistilată, adăugîndu-se apoi 2 *ml* acid tricloracetic 20%, în timp ce se agită flaconul. După 10 minute se filtrează printr-o hîrtie de filtru lipsită de metale. (De ex. Schleicher-Schüll *N* 589 III), captîndu-se filtratul într-o eprubetă. Din acest filtrat se pipetează 5 *ml* și se trece într-o pîlnie de separație de 30—50 *ml,* care conține 1 *ml* soluție pirofosfat de sodiu (reactiv 2), 0,5 *ml* amoniac (reactiv 3), 2,5 *ml* alcool amilic (reactiv 4) și 0,5 *ml* soluție dietilditiocarbamat de sodiu (reactiv 5). Se agită bine timp de un minut și se lasă apoi în repaus pentru separarea celor două faze. Stratul superior în alcool amilic apare colorat în galben. Se prepară o probă în alb, conținînd 8 *ml* apă bidistilată și 2 *ml* acid tricloracetic 20% și o probă standard conținînd 2 *ml* soluție standard de cupru (200 μg/100 *ml*), 6 *ml* apă bidistilată și 2 *ml* acid tricloracetic 20%. Evident proba în alb și proba standard nu trebuie filtrate. Se iau cîte 5 *ml* din proba în alb și din standard și se trec în cîte o pîlnie de separare, procedîndu-se în continuare ca și în cazul probei de analizat.

După ce s-a obținut separarea stratului superior în alcool amilic se îndepărtează cu grijă stratul apos inferior. Faza organică (în alcool amilic) se filtrează pentru a se îndepărta, picăturile de soluție apoasă care mai există și care pot produce opalescență. Se măsoară apoi extincțiile soluțiilor clare ale probei de analizat și probei standard față de proba în alb la 430 *nm.*

Calcul. Cupru seric $\mu g/100\ ml = \frac{E \text{ proba}}{E \text{ standard}} \times 200$

Valori normale: 100—130 μg/100 *ml.*

Observații. O variantă simplificată a metodei constă în amestecarea a 4 *ml* ser cu 2 *ml* HCl 6 *N.* După 10 minute se adaugă 2 *ml* acid tricloracetic 20% și se filtrează. La 1 *ml* filtrat se adaugă 1,3 *ml* alcool etilic, 0,2 *ml* amoniac 20%, iar după răcire se adaugă o picătură soluție dietilditiocarbamat 2% în alcool. În condiții identice se pregătesc o probă în alb și un standard și se citesc extincțiile la 440 *nm.*

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. Mc Farlane, W. D., Biochemical J., 26 (1932), p. 1022. 2. Schmidt, H. G., Biochem. Z. 302, (1939), 302.

7.7.4. | DETERMINAREA CERULOPLASMINEI

Ceruloplasmina, o alfa$_2$globulină conţinînd cupru, poate fi dozată prin metode imunochimice (Hitzig), pe baza determinării conţinutului în cupru, după o prealabilă separare a proteinei prin cromatografie pe coloană (Devaux), pe baza activităţii sale de ferooxidază (Johnson şi colab.) sau pe baza activităţii sale enzimatice ca fenoloxidază (Ravin).

După părerea noastră, ultima metodă este mai potrivită pentru laboratorul clinic. Această metodă este descrisă la capitolul enzime (vezi pag. 330).

BIBLIOGRAFIE

1. Hitzig, H. W., Helv. Ped. Acta, 16 (1961), 46. 2. Devaux, G., Crockett, R., Iouzier, E., Bachet-Liermain, A., Ruffia, A., *Choix de Techniques de biochimie clinique*, Ed. Gauthier-Villars, Paris, 1970. 3. Johnson, D. A., Osaki, S., Frieden, E., Clin. Chem., 13 (1967), 142. 4. Ravin, H. A., J. Lab. Clin. Med., 58 (1961), 161.

7.7.5. | INTERPRETAREA MODIFICĂRILOR PATOLOGICE ALE SIDEREMIEI ŞI CUPREMIEI

Pentru interpretarea sideremiei este important de precizat că nivelul acesteia prezintă variaţii în cursul zilei, fierul seric fiind cu 20—30 µg mai crescut dimineaţă decît seara. Pe de altă parte atît sideremia cît şi cupremia variază cu vîrsta. În comparaţie cu valorile întîlnite la adulţi (80—140 µg/100 *ml*) fierul seric este mai crescut în primele 5—8 zile de la naştere (icterul fiziologic al nou-născutului). În perioada alimentaţiei lactate, nivelul fierului seric tinde să scadă sub valorile adultului, atingînd aceste valori după vîrsta de 6 ani. Capacitatea totală de fixare a fierului este mai scăzută la naştere, pentru ca la sugari valorile transferinei să fie de regulă mai ridicate decît la adult (saturarea transferinei este de abia 22—25% la sugari).

În opoziţie cu sideremia, cupremia este scăzută la nou-născut (în medie 65 µg/100 *ml*, în comparaţie cu valorile de 80—140 µg/100 *ml* întîlnite la adult). La copii (5—17 ani), cupremia e de 164 µg/100 *ml*.

Ceruloplasmina este de asemeni scăzută la nou-născut (în medie 10 *mg*/100 *ml* faţă de 30—36 *mg*/100 *ml* la adult).

Scanned with OKEN Scanner

Nivelul sideremiei scade în anemiile feriprive şi în cursul activării bruşte a hematopoezei (de exemplu după tratamentul cu vitamina B_{12} la bolnavii cu anemie megaloblastică). Scăderi ale fierului seric se pot întîlni în infecţii acute şi cronice şi în caz de tumori maligne (fierul reţinut în sistemul reticulo-endotelial).

Fierul seric creşte în anemii aplastice, în anemiile megaloblastice netratate, în anemiile hemolitice şi în leziuni hepatocelulare (eliberarea fierului stocat în hepatocite). Cele mai importante creşteri al sideremiei se întîlnesc în hemosideroze şi hemocromatoze (boli caracterizate printr-o acumulare excesivă de fier în organism).

Capacitatea totală de fixare a fierului creşte în anemiile feriprive (ca mecanism compensator faţă de lipsa de fier). Scăderi ale capacităţii de fixare a fierului se constată în sindromul nefrotic, infecţii acute şi cronice şi procese maligne. S-a semnalat şi absenţa totală a siderofilinei (Atransferinemie) avînd un caracter genetic. În hemocromatoze creşterea fierului seric coincide cu o scădere a capacităţii totale de fixare a fierului (de regulă sub 300 μg/100 *ml*), astfel încît saturarea siderofilinei în astfel de situaţii este de 80% şi nu de 30—40% cît se constată la normali.

Nivelul cupremiei creşte în infecţii acute şi cronice (în opoziţie cu modificările sideremiei). De regulă ceruloplasmina, care conţine peste 90% din cuprul plasmatic, se modifică în acelaşi sens cu cupremia, fiind crescută în infecţii, graviditate, afecţiuni hepato-biliare (în special hepatite colostatice şi ciroze biliare), tireotoxicoză şi insuficienţa cardiacă cu ficat de stază.

Scăderi ale cupremiei şi ceruloplasminei se întîlnesc în unele anemii hipocrome ale sugarului, în sindromul nefrotic şi în degenerescenţa hepato-lenticulară (boala lui Wilson). În boala lui Wilson hipocupremia se însoţeşte de o depunere de cupru în ţesuturi.

BIBLIOGRAFIE

1. Baciu, I., Cucuianu, M., Prundeanu, P., Bociat, A., Rev. Roum. Med. Int. 2 (1965), 291. 2. Harper, H. A., Rewiew of Physiological Chemistry, Lange Medical Publications. Los Altos, California, 1970. 3. Todorov, I., *Klinische Laboratoriums Untersuchungen im Kindesalter*, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1970.

8. | DETERMINAREA ENZIMELOR PLASMATICE

Principiile analizei enzimatice au fost expuse anterior la partea generală. Reamintim doar că dozarea enzimelor se bazează pe proprietatea acestor biocatalizatori de a accelera o anumită reacţie şi că, în

Scanned with OKEN Scanner

principiu, determinarea enzimelor se face prin măsurarea scăderii substratului asupra căruia acţionează enzima, într-un interval de timp fix, sau prin măsurarea produşilor ieşiţi din reacţia de transformare a substratului într-un interval de timp fix. O altă metodă constă în urmărirea dinamică (cinetică) a utilizării substratului sau a formării produsului de reacţie.

Tot în partea generală s-a arătat modalitatea de exprimare a activităţii enzimatice, definindu-se noţiunea de unitate enzimatică internaţională şi de miliunitate (*mU*), precum şi încercările de a se transforma diversele unităţi clinice uzuale în unităţi internaţionale. Menţionăm însă că utilizarea diverşilor factori de conversie nu este întotdeauna aplicabilă şi că mici modificări ale tehnicii de lucru produc variaţii mari ale activităţii enzimatice, fapt care îngreunează compararea rezultatelor obţinute de diverse laboratoare. Din acest motiv este mai recomandabil ca fiecare laborator să-şi stabilească valorile normale pentru tehnica pe care a adoptat-o şi în condiţiile de lucru care îi sînt accesibile.

8.1. | Determinarea activităţii amilazei

Amilazele sînt enzime care catalizează degradarea hidrolitică a amidonului. Ele acţionează asupra legăturilor 1—4 glicozidice, cu producerea de oligozaharide reducătoare. După poziţia legăturii atacate în lanţul poliozidic distingem endoamilaze (α-amilaze) şi exoamilaze (β-amilaze).

Activitatea amilazică a sîngelui sau urinei se datoreşte trecerii enzimelor tisulare (din pancreas şi glandele salivare) în umori.

Metodele cele mai utilizate pentru determinarea activităţii amilazice se bazează fie pe determinarea cantităţii de substrat (amidon) rămas nehidrolizat, fie pe determinarea zahărului reducător format în urma acţiuni enzimei. Întrucît aceste ultime metode (metoda zaharogenică a lui Somogyi) sînt influenţate de prezenţa unei hiperglicemii sau a unei glicozurii, cele mai recomandabile metode rămîn cele bazate pe determinarea amidonului rămas nehidrolizat.

8.1.1. | METODA SMITH ŞI ROE (MODIFICATĂ)

Principiu. Se determină intensitatea culorii date în prezenţa iodului de către amidonul rămas nehidrolizat sub acţiunea amilazei. O unitate amilazică corespunde unei activităţi enzimatice care degradează 10 *mg* amidon in vitro, în decurs de 30 minute.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi. *1*) Amidon 2%. Se suspendă 2 *g* amidon solubil în 10 *ml* apă distilată, într-un balon cotat de 100 *ml*. Se aduce volumul pînă sub 100 *ml* cu apă distilată fierbinte, agitîndu-se mereu, şi se încălzeşte pe o baie de apă la fierbere pînă cînd soluţia devine clară. După răcire se completează la 100 *ml* cu apă distilată. Se păstrează pînă la 10 zile la +4°C. *2*) Tampon fosfat, *pH* 7,1 se dizolvă 7,62 *g* fosfat monopotasic anhidru (KH_2PO_4) şi 24,45 *g* fosfat disodic anhidru (Na_2HPO_4) în apă distilată şi se aduce volumul la 1000 *ml*. Pentru conservare se pot adăuga cîteva picături de toluen. În locul fosfatului disodic anhidru se pot folosi 61,7 *g* fosfat disodic cristalizat ($NaHPO_4 \cdot 12H_2O$). *3*) Soluţie NaCl 0,3%. *4*) Soluţie de iod 0,1 *N*. Se dizolvă 25 *g* iodură de sodiu în aproximativ 40 *ml* apă distilată şi se adaugă apoi 12,7 *g* iod metalic (resublimat, p.a.). Vasul de 1 *l*, închis cu dop rodat, se agită, pînă cînd tot iodul trece în soluţie. Se completează apoi la 1000 *ml* cu apă distilată. *5*) Acid clorhidric 1 *N*.

Tehnica. Pentru fiecare probă de analizat se pipetează cîte 5 *ml* soluţie amidon (reactiv 1), 3 *ml* tampon fosfat (reactiv 2) şi 1 *ml* soluţie NaCl (reactiv 3). Se amestecă bine şi se aduce temperatura la 37°C pe o baie de apă. Se adaugă apoi 1 *ml* ser de analizat, se amestecă bine şi se incubează în continuare la 37°C.

După exact 30 minute se adaugă 2 *ml* HCl 1 *N* pentru oprirea reacţiei enzimatice (inactivarea amilazei). În paralel se pregăteşte o probă martor conţinînd aceiaşi reactivi cu deosebirea că adăugarea celor 2 *ml* HCl 1 *N* se face imediat după pipetarea serului. (Se inactivează enzima de la început).

Între timp se prepară amestecul pentru reacţia de culoare dată de amidonul rămas nehidrolizat. În acest scop pentru fiecare probă de analizat şi respectiv pentru fiecare probă martor se pregăteşte cîte un balon cotat de 50 *ml* în care se pipetează 40 *ml* apă distilată, 0,5 *ml* HCl 1 *n* (reactiv 5) şi 0,2 *ml* soluţie de iod (reactiv 4). După terminarea incubării se adaugă cîte 0,5 *ml* din proba de analizat şi respectiv din proba martor în baloanele cotate de 50 *ml* conţinînd amestecul de reacţie arătat mai sus. Se aduce volumul la 50 *ml* cu apă distilată şi se citesc extincţiile la 578 *nm* faţă de apă distilată, în cuve cu grosimea stratului de 1 *cm*.

Calcul. Unităţi amilazice/100 *ml* ser $= \frac{E \text{ martor} - E \text{ probă}}{E \text{ martor}} \times 1000$

Valori normale: 60—200 unităţi amilazice la 100 *ml* ser.

Interpretarea modificărilor patologice. Valori crescute (de 5—10 ori valorile normale) se întîlnesc în pancreatitele acute şi în puseurile acute ale unei pancreatite cronice. Dat fiind că enzima se elimină prin

Scanned with OKEN Scanner

urină, amilazemia va creşte şi în insuficienţele renale. Creşteri moderate se descriu în carcinoame ale capului pancreasului, în afecţiuni abdominale acute (ulcer perforat, ocluzia intestinală, colecistită acută) şi în afecţiuni ale glandelor salivare (parotidită, calcul salivar sau după sialografie). Scăderile moderate, constatate în atrofiile pancreasului, au o valoare diagnostică redusă.

Observaţii. 1. Pentru valori mari ale activităţii enzimatice (digerare de peste 60% a amidonului din probă) se recomandă utilizarea unor diluţii ale serului de analizat ţinîndu-se cont de această diluare la efectuarea calculului.

2. Metoda poate fi utilizată şi pentru dozarea amilazei în urină. În acest caz la exprimarea rezultatelor se va ţine cont de diureză. În acest scop se va măsura urina eliminată pe timp de două ore obţinîndu-se o medie a urinei emise pe timp de o oră. Amilazuria la 100 *ml* urină se va transforma în amilazurie pe timp de o oră în funcţie de diureză. De exemplu, pe lîngă o diureză de 200 *ml*/oră şi o amilazurie de 100 unităţi amilazice/100 *ml* urină — rezultatul se va da sub formă de 200 unităţi amilazice/oră. Valorile normale în urină sînt de 30—270 unităţi/oră.

Unităţile Smith—Roe sînt în mare măsură superpozabile unităţilor Somogyi (O unitate Somogyi reprezentînd activitatea enzimatică care hidrolizează 5 *mg* amidon în decurs de 15 minute la 37°C).

BIBLIOGRAFIE

Smith, B. W., Roe, J. H., J. biol. chem., 178 (1949), p. 53. Kern, E., Lo, H. W., Flux, Ch., Schimmelpfennig, H., Billmann, U. Klin. Wschr., 35 (1957), p. 572.

8.1.2. METODA ULTRAMICROANALITICĂ CU AMILOZĂ (STREET—CLOSE)

Principiu. Se determină cantitatea de amiloză nehidrolizată de către enzimă, după incubare 15 minute la 37°C, prin reacţia de culoare dată de iod, comparativ cu o probă standard lipsită de activitate enzimatică.

Reactivi. 1) Soluţie amiloză. a) Soluţie stoc (1%). Peste 80 *ml* soluţie NaOH 0,1 *N*, încălzită la 90°, se adaugă o suspensie de 1 *g* amiloză în 5 *ml* alcool etilic. După răcire, soluţia se transferă într-un balon cotat şi se diluează la 100 *ml* cu NaOH 0,1 *N*. Se păstrează la temperatura camerei. (Prepararea amilozei este descrisă la pag. 289). *b)* Soluţie diluată de amiloză (0,1%). 10 *ml* soluţie stoc se diluează la 100 *ml* cu apă distilată. *2) Soluţie tampon fosfat 0,02 M, pH 7.* Se dizolvă 3,471 *g* Na_2HPO_4 şi 2,118 *g* KH_2PO_4 în apă distilată şi se diluează la 2 litri. *3) Soluţie HCl 0,01 N. 4) Soluţie NaCl 0,85%.*

5) Soluţie iod—iodură K: a) Soluţie stoc (0,1 *N*). Se dizolvă 30 g KI în 250 *ml* apă distilată, se dizolvă 12,7 g iod cu această soluţie şi se diluează la 1 litru cu apă distilată. *b)* Soluţia diluată 0,01 *N.*, 10 *ml* soluţie stoc se diluează la 100 *ml* cu apă distilată. *6) Soluţie tampon substrat.* Se prepară înainte de utilizare din 5 *ml* (reactiv 2) + 2 *ml* (reactiv 3) + 2 *ml* (reactiv 1.b) + 1 *ml* (reactiv 4).

Tehnica. În 2 eprubete se pipetează următorii reactivi:

Reactivi	*Probă*	*Martor*
NaCl 0,85%	0,1 *ml*	0,1 *ml*
preincubare la 37°—5 *min.*		
Ser	0,01 *ml*	—
Soluţie tampon substrat (preîncălzit la 37°)	1 *ml*	1 *ml*
incubare 15 minute la 37°		
apă distilată	10 *ml*	10 *ml*
Soluţie I_2/KI	0,6 *ml*	0,6 *ml*

Se agită puternic probele şi se citesc extincţiile faţă de apă distilată la 620 *nm* în cuva de 1 *cm.*

Calcul. Unităţi Street-Close/100 *ml* ser $= \frac{E \text{ martor} - E \text{ probă}}{E \text{ martor}} \times 100$

Produsul de analizat conţine 1 unitate Street—Close/1 *ml* atunci cînd 0,1 *ml* din acest produs (sau 1 *ml* diluat 1/10) hidrolizează 2 *mg* amiloză în 15 minute la *pH* 7 şi 37°C.

Valori normale: 9—50 U Street—Close/100 *ml* ser (54—308 mU/ml).

Valoarea diagnostică: vezi pct. 8.1.1.

Observaţii. Dacă culoarea probei nu este albastră-verzuie, serul conţine prea multă amilază. În acest caz se repetă analiza utilizîndu-se diluţii ale serului de analizat şi ţinîndu-se cont de diluţie la calcul.

Metoda poate fi aplicată şi pentru volume mai mari de ser (metodă microanalitică), folosindu-se amestecul de 0,1 *ml* ser diluat 1/40 cu NaCl 0,1 *N* (0,58%) la care se adaugă 5 *ml* tampon fosfat, 2 *ml* soluţie amiloză şi 2 *ml* HCl 0,01 *N*. Proba martor conţine aceiaşi reactivi cu excepţia serului de analizat. Atît proba cu ser de analizat cît şi martorul se efectuează în baloane cotate de 100 *ml*, care se ţin pe baie de apă la 37°C timp de 15 minute. După acest interval de timp se adaugă 80 *ml* apă distilată şi 4 *ml* soluţie de iod (reactiv 5) completîndu-se volumul la 100 *ml* cu apă distilată. Se citesc extincţiile la 620 *nm* faţă de apă distilată.

Calcul. Unităţi Street-Close/100 *ml* ser $= \frac{E \text{ martor} - E \text{ probei}}{E \text{ martor}} \times 400$

Determinarea rapidă fără folosirea fotometrului (mai simplă şi mai precisă decît metoda Wohlgemuth) se poate face astfel: se introduc într-o eprubetă 1,0 ml soluţie tampon substrat (6) şi 0,1 ml ser (ambele preîncălzite la 25°); se agită, se lasă 4 min. la 25°, apoi se adaugă 0,5 *ml* reactiv

Scanned with OKEN Scanner

I_2/KI (5b). Se agită şi după 5 min. se evaluează activitatea amilazică pe baza culorii: o culoare albastră (închis ori deschis): valori normale (<50 u. Street Close, <300 mU/ml, <160 u. Somogyi); roşie-violetă: valori la limită (50—70 u. Street Close, 300—450 mU/ml, 160—230 u. Somogyi); galbenă: valori patologice (>70 u. Street-Close, >450 mU/ml, >230 u. Somogyi).

Prepararea amilozei. Din 30 g amidon de porumb şi 150 *ml* de apă se prepară o pastă care se toarnă în 1500 *ml* soluţie fierbinte de NaCl 2%. Soluţia fierbinte se agită mecanic (cu ajutorul unui agitator magnetic), pînă cînd devine omogenă. Se filtrează fierbinte prin tifon dublu. La filtratul răcit se adaugă 4,5 pudră de timol (para-izopropil-meta cresol) şi se agită 48 de ore. Se decantează supernatantul care conţine amilopectina. Precipitatul format din complexul amiloză-timol se separă de lichidul rezidual prin centrifugare, se spală precipitatul de 6 ori cu apă saturată cu timol şi de 6 ori cu etanol absolut. Reziduul se scoate pe o sticlă de ceas şi se usucă 6 ore la 37°C. Randament: 3—6 *g* amiloză. Pudra albă obţinută se păstrează la temperatura camerei într-o sticlă brună bine închisă.

BIBLIOGRAFIE

Street, H. V., „Amylase" in E, Merck, Darmstadt, Germany, „Clinical Laboratory", ed. 11, 1974. „Methods of Enzymatic Analysis" (1965), p. 854—858. Ed. Hans Ulrich Bergmeyer.

8.1.3. | METODA WOHLGEMUTH

Principiu. Se apreciază cantitatea minimă de ser, capabilă să hidrolizeze 0,4 *ml* soluţie de amidon 1‰, la temperatura de 38°C, în timp de 30 minute. Rezultatele se exprimă în unităţi Wohlgemuth.

Reactivi. 1) Suspensie de amidon 1‰: amidonul comercial se majorează într-un mojar de sticlă cu apă pînă obţinem o pastă uniformă. Se trece în mod cantitativ într-un Erlenmeyer şi se agită bine. Se aduce amestecul la fierbere, păstrînd suspensia formată timp de 30 de minute pe baia de apă la fierbere. Se răceşte la temperatura camerei şi se completează cu apă în aşa fel ca să obţinem o soluţie de amidon 1‰. Soluţia se păstrează la frigider. *2)* Soluţie de iod 0,02 *N*. *3)* Soluţie de clorură de sodiu izotonică 0,9% (ser fiziologic).

Tehnica. Dozarea se poate efectua atît în ser cît şi în urină. În 10 tuburi de hemoliză se pipetează cîte 0,2 *ml* NaCl. În prima eprubetă se adaugă 0,2 *ml* ser. Pentru obţinerea seriei de diluţie a serului, se iau din prima eprubetă 0,2 *ml* soluţie (după ce în prealabil a fost bine agitată) şi se trece în a 2-a, după ce se agită bine, se iau 0,2 *ml* din cea de a 2-a eprubetă şi se trece în a 3-a. Din aceasta, după agitarea conţinutului, se trec 0,2 *ml* în a 4-a eprubetă şi aşa mai departe.

Scanned with OKEN Scanner

Cei 0,2 *ml* recoltaţi din ultima eprubetă se aruncă. Se obţin astfel următoarele diluţii: 1/1, 2/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă cîte 0,4 *ml* soluţie amidon 1‰, se agită bine şi probele se introduc fie într-o baie de apă, la 38° timp de 30 de minute. După acest interval eprubetele se răcesc la un curent de apă şi se adaugă 1 picătură de soluţie de iod 0,02 *N* în fiecare eprubetă. Se notează eprubeta în care nu mai apare culoarea albastră.

Calcul. U.D. (38°) 30 *min* = 2^x unităţi diastazice (unităţi Wohlgemuth), unde x = numărul exprubetei unde nu mai apare culoarea albastră. 1 U.D. (unitate diastazică) reprezintă cantitatea de enzimă capabilă să hidrolizeze 0,2 *ml* soluţie de amidon 1‰ în condiţiile descrise.

Primul tub care conţine 0,2 *ml* ser şi 0,4 *ml* soluţie amidon 1‰, corespunde la 2 unităţi Wohlgemuth, a doua eprubetă la 4 unităţi Wohlgemuth, a 3-a la 8, apoi 16, 32 etc.

Valori normale: 8—32 unităţi Wohlgemuth.

Observaţii. Această metodă furnizează doar relaţii semicantitative şi poate fi utilizată doar pentru orientare.

BIBLIOGRAFIE

Manta, I., Ciplea, Al., *Metodele laboratorului clinic*, Cartea Românească, Cluj. 1947.

8.2. | Determinarea lipazei

Determinarea activităţii lipazei serice se bazează pe proprietatea acestei enzime de a hidroliza esterii acizilor graşi. Acizii graşi eliberaţi se pot doza apoi titrimetric sau colorimetric. Folosind ca substrat esteri ai acizilor graşi (acid lauric sau acid miristic) cu beta-naftolul (2-naftol) activitatea enzimei se poate măsura, dozînd colorimetric beta-naftolul eliberat prin hidroliza esterului de beta-naftol.

8.2.1. | DOZAREA TITRIMETRICĂ A LIPAZEI SERICE (CHERRY ŞI CRANDALL)

Principiu. Acizii graşi, eliberaţi prin hidroliza uleiului de măsline, sub acţiunea lipazei serice, se titrează cu hidroxid de sodiu 0,05 *N*.

Reactivi. *1*) Substrat de ulei de măsline. Se dizolvă 0,4 g benzoat de sodiu în 100 *ml* apă distilată. Se adaugă 5 g gumă acacia pură şi se agită bine pentru o dizolvare cît mai completă. Se transferă într-un omogenizator (Warring Blendor sau un alt dispozitiv de amestecare prin agitare). Se adaugă 100 *ml* ulei de măsline de calitate cît mai bună. Se agită bine pînă la obţinerea unei emulsii stabile. Se păstrează la +4°C, timp de pînă la 10 zile. Dacă există o tendinţă de separare a fazei apoase se agită din nou pentru reemulsifi-

Scanned with OKEN Scanner

care. 2) Tampon fosfat, *pH* 7,0. Se dizolvă 5,785 *g* fosfat disodic (Na_2HPO_4 și 3,532 *g* fosfat mono potasic (KH_2PO_4) în 500 *ml* apă distilată și se aduce volumul la 1000 *ml* cu apă distilată. *3*) Alcool etilic 95%. *4*) Hidroxid de sodiu 0,05 *N*, titrat în prealabil și păstrat în absența de CO_2. *5*) Indicator de timolftaleină. Se dizolvă 1 *g* timolftaleină în alcool etilic 95% și se aduce volumul la 100 *ml* de alcool etilic 95%.

Tehnica. Se pregătesc două flacoane Erlenmeyer de 125 *ml*, din care unul pentru probă, iar celălalt pentru martor. În probă se pipetează 1 *ml* ser de analizat, 0,5 *ml* tampon fosfat, 2 *ml* substrat de oleu de măsline (reactiv 1) și 3 *ml* apă distilată. În martor se pun 1 *ml* ser, 0,5 *ml* tampon, 2 *ml* substrat, 3 *ml* apă distilată și 3 *ml* etanol 95%. (Etanolul se adaugă pentru inactivarea enzimei). Se amestecă bine conținutul flacoanelor, se astupă și se incubează la 37°C pe timp de 16—18 ore (de preferință în timpul nopții).

Se scot flacoanele din baia de apă, se adaugă 3 *ml* alcool etilic 95% în probă, pentru oprirea reacției, și apoi se pipetează 5 *ml* indicator de timolftaleină, atît în probă cît și în martor. Se titrează cu hidroxid de sodiu 0,05 *N* dintr-o microbiuretă pînă la apariția culorii albastre (virajul timolftaleinei).

Calcul. Unități lipazice = mililitri NaOH 0,05 *N*, utilizați pentru probă — mililitri NaOH utilizați la martor.

Valori normale. Pînă la 1,5 unități. Majoritatea serurilor normale prezintă activități sub 1 unitate.

Observații. Metoda este simplă și utilizează reactivi ieftini și ușor de procurat. Necesită însă incubație îndelungată. De notat că titrul martorului trebuie să rămînă constant. Dacă există o creștere a acidității în martor — substratul trebuie preparat proaspăt.

BIBLIOGRAFIE

Cherry, I. S., Crandall, L. A., Am. J. Physiol, 100 (1932) 266.

8.2.2. | DOZAREA COLORIMETRICĂ (KRAMER ȘI COLAB.)

Principiu. Lipaza serică activată în prezența colatului de sodiu hidrolizează miristatul de beta-naftil (2-naftil miristat), eliberînd beta-naftol (2-naftol) care este apoi dozat colorimetric pe baza reacției cu ortodianisidina tetraazotată (Fast—Blue B).

Reactivi. 1) Substrat de miristat de beta-naftil (beta-naphtyl myristate — Mann Research Lab., New York). Se dizolvă 50 *mg* miristat de beta-naftil în 250 etilenglicolmonoetileter (Cellosolve, 2-ethoxyethanol). Se păstrează nealterat la temperatura camerei timp de 7 zile. *2*) Soluție colat de sodiu. Se dizolvă 1,9 *g* acid colic pur în 10 *ml* apă

Scanned with OKEN Scanner

distilată şi se ajustează cu NaOH 1 *N* la *pH* 7,4, aducîndu-se apoi volumul la 20 *ml* cu apă distilată. *3*) Tampon tris 0,4 *M*, *pH* 7,4. Se dizolvă 48,456 *g* tris (trihidroximetil-aminometan) în 500 *ml* apă distilată. Se adaugă acid clorhidric 0,4 *N* pînă la *pH* 7,4 (aproximativ 414 *ml* HCl 0,4 *N*) şi se aduce volumul la 1000 *ml* cu apă distilată. Se păstrează la +4°C. *4*) Ortodianisidină tetraazotată (Fast—Blue B — General Aniline Corporation, New York) 4 *mg/ml*. Se dizolvă 40 *mg* substanţă în 60 *ml* apă distilată înainte de utilizare. *5*) Standard de beta-naftol. Se dizolvă 36 *mg* beta-naftol în 500 *ml* etilenglicol monoetileter (2-ethoxy-etanol) şi se amestecă bine. Avîndu-se în vedere că greutatea moleculară a beta-naftolului este 144,164, soluţia standard conţine 0,5 $\mu M/ml$.

Tehnica. 0,2 *ml* din serul de analizat se amestecă, într-o eprubetă, cu 0,5 *ml* colat de sodiu, 2 *ml* tampon tris şi 1,3 *ml* apă distilată. În paralel se pregăteşte un martor lipsit de colat de sodiu şi conţinînd 0,2 *ml* ser, 2 *ml* tampon tris şi 1,8 *ml* apă distilată. (În lipsa colatului de sodiu activitatea lipolitică este minimă şi nu se datoreşte lipazei pancreatice ci altor esteraze). Se adaugă apoi 0,2 *ml* substrat (miristat de beta-naftil) atît în probă cît şi în martor şi se incubează pe baie de apă la 37°C, timp de 5 ore.

Se scot eprubetele de la incubat şi li se adaugă 1 *ml* ortodianisidină diazotată (reactiv 4). După exact 3 minute se adaugă în toate eprubetele cîte 3 *ml* acid acetic glacial şi se amestecă imediat.

Se citesc extincţiile probei şi martorului la 540 *nm* faţă de apă distilată. Întrucît, extincţia este modificată de prezenţa în acelaşi amestec a colatului de sodiu şi a serului, valoarea extincţiei citite în proba de analizat se înmulţeşte cu un factor de corecţie de 0,79. Se scade apoi valoarea extincţiei martor din extincţia corectată a probei de analizat.

Pentru calcul este necesară efectuarea reacţiei de culoare şi cu o probă standard de beta-naftol. În acest scop se amestecă 0,2 *ml* soluţie standard de beta-naftol (reactiv 5) cu 0,5 *ml* colat de sodiu, 2 *ml* tampon tris şi 1,5 *ml* apă distilată. Se adaugă 1 *ml* ortodianisidină diazotată, se agită şi, după 3 minute, se amestecă rapid cu 3 *ml* acid acetic glacial. Se citeşte extincţia la 540 *nm* faţă de apă distilată.

Calcul. Rezultatele se exprimă în unităţi internaţionale, o unitate fiind activitatea enzimatică care scindează 1 μMol de substrat în decurs de un minut. Pentru ser raportarea activităţii se face la 1000 *ml*; se poate utiliza şi exprima sub formă de miliunităţi/*ml* (*mU/ml*). $mU = \frac{1 \text{ unitate}}{1000}$. Din punct de vedere numeric valorile activităţii enzimatice în unităţi internaţionale sau în *mU/ml* sînt identice.

La calcul se va ţine cont de următoarele:

Scanned with OKEN Scanner

a) Extincţia probei de analizat este corectată aşa cum s-a arătat mai sus.

b) Concentraţia standardului de beta-naftol este de 0,5 *µMol/ ml* iar în reacţie s-au luat 0,2 *ml* de soluţie respectiv 0,10 *µMoli.*

c) Cantitatea de ser din care s-a măsurat activitatea enzimatică este de 0,2 *ml.* Se va înmulţi deci cu 5 pentru a se raporta activitatea la 1 *ml* şi cu 1000 pentru a obţine unităţi internaţionale/1000 *ml* ser (sau *mU/ml*).

d) Incubarea s-a efectuat timp de 5 ore (300 minute). Se va împărţi deci la 300 pentru a obţine activitatea pe timp de 1 minut.

În consecinţă:

Activitatea lipazică în

$$mU/ml = \frac{[(E \text{ probei} \times 0{,}79) - E \text{ martor})] \times 0{,}10 \times 5 \times 1000}{E \text{ standard} \times 300}$$

$$mU/ml = \frac{(E \text{ probei} \times 0{,}79) - E \text{ martor}}{E \text{ standard}} \times 1{,}67$$

Valori normale: 0,37—2,46 *mU/ml.* Activitatea lipazică a serului creşte alături de activitatea amilazei în afecţiuni inflamatorii acute ale pancreasului, creşterea lipazei este însă mai persistentă.

Observaţii. Pentru o precizie mai mare atît proba cît şi martorul se pot efectua în dublu exemplar, luîndu-se în calcul o medie a extincţiilor citite. Pentru activităţi lipazice mult crescute este recomandabil să se efectueze diluţii ale serului de analizat ţinîndu-s cont de diluţie la calcul.

BIBLIOGRAFIE

Kramer, S. P., Bartalos, M., Karpa, J. N., Mindel, J. S., Chang, A. and Seligman, A. J., J. Surg. Res., 4, (1964), 23.

8.3. | Determinarea colinesterazei serice

Organismul posedă enzime capabile să producă hidroliza esterilor colinei cu diverşi acizi organici. Un grup de astfel de enzime se găseşte în ţesutul nervos şi în eritrocite şi are efect predominant asupra acetil-colinei. Aceste enzime sînt incluse sub termenul de *acetil-colinesterază.* Ele se găsesc doar în cantităţi mici în ser şi au o importanţă diagnostică redusă. Pentru clinică sînt mai importante colinesterazele produse în ficat şi secretate în plasmă. Astfel de enzime acţionează atît asupra acetilcolinei cît şi asupra altor compuşi ai colinei cum ar fi butiril-colina, benzoil-colina, succinil-colina etc. Acest grup de enzime este cunoscut sub termenul de *colinesterază serică* (colinesterază nespe-

Scanned with OKEN Scanner

cifică sau pseudocolinesterază). Termenul ştiinţific recomandat de Uniunea Internaţională de Biochimie este acela de acil:colin-acilhidrolază.

Există numeroase tehnici de dozări a colinesterazelor bazate fie pe modificările de *pH* produse prin eliberarea acizilor din esterii colinei, fie pe determinări colorimetrice sau spectrofotometrice ale substratului hidrolizat.

8.3.1. | METODA CINETICĂ (ELLMAN ŞI COLAB.)

Principiu. Din hidroliza acetiltiocolinei sub acţiunea enzimei rezultă tiocolină care împreună cu ditiobisnitrobenzenul formează un complex care absoarbe la 405 *nm*. Activitatea enzimei se calculează din variaţiile extincţiei pe timp de 30 secunde.

Reactivi. 1) Soluţie ditiobisnitrobenzen (DTNB) 0,25 *mM*, tampon fosfat, *pH* 7,2, 50 *mM:* se dizolvă 99,1 *mg* acid ditiobisnitrobenzen în 1000 *ml* tampon fosfat 50 *mM*, *pH* 7,2. *2*) Soluţie acetiltiocolină 0,156 *M:* se dizolvă 451 *mg* în 10 *ml* apă.

Tehnica. Se utilizează ser fără hemoliză (plasma nu se poate utiliza). Măsurătorile se fac în cuva spectrofotometrului la 25°C, faţă de aer, în cuvă de 1 *cm*.

Se pipetează în cuvă 3 *ml soluţie*. 1. (DTNB) 20 µl ser şi 0,1 *ml* soluţie 2. Se amestecă cu o spatulă mică de plastic, se citeşte imediat densitatea optică, se porneşte în acelaşi timp cronometrul şi se repetă citirile după 30, 60 şi 90 s.

Calcul. Se calculează variaţia de extincţie pe *30* s ($\Delta E/30$ *s*). Dacă măsurătorile se fac la linia mercurului (Hg 405 *nm*) se poate utiliza formula: $\Delta E/30\ s \times 23400 = mU/ml$ sau se pot obţine valorile activităţii direct din tabelul nr. 17.

TABEL 17

CORESPONDENŢA ÎNTRE Δ E/30 *s* ŞI ACTIVITATEA PSEUDOCOLINESTERAZEI ÎN *mU/ml*.

$\Delta E/30\ s$	*mU/ml*	$\Delta E/30\ s$	*mU/ml*	$\Delta E/30\ s$	*mU/ml*
0,010	235	0,075	1755	0,140	3275
15	350	80	1870	145	3395
20	470	85	1990	150	2510
25	585	90	2105	155	3625
30	700	95	2225	160	3745
35	820	0,100	2340	165	3860
40	935	105	2455	170	3980
45	1055	110	2575	175	4095
50	1170	115	2690	180	4210
55	1285	120	2810	185	4330
60	1405	125	2925	190	4445
65	1520	130	3040	195	4565
0,070	1640	0,135	3160	0,200	4680

Scanned with OKEN Scanner

Pentru fotometrele la care nu se poate izola lungimea de undă 405 *nm*, se vor face măsurători la 400—420 *nm* (filtru albastru). Dat fiindcă cisteina reacţionează şi ea cu ditiobisnitrobenzenul (reactiv 1), calculul se va face pe baza extincţiilor obţinute cu o curbă de etalonare, preparată cu o soluţie de cisteină hidroclorică 0,2 *mM* şi soluţie de ditiobisnitrobenzen (DTNB), în felul următor:

Eprubeta nr.	*ml sol. cisteină 0,2 mM*	*ml soluţie 1*	*mU/ml*
1	—	3,10	—
2	0,05	3,05	1000
3	0,10	3,00	2000
4	0,15	2,95	3000
5	0,20	2,90	4000
6	0,25	2,85	5000

Se amestecă, se citesc apoi extincţiile eprubetelor 2—6 faţă de eprubeta nr. 1. Se reprezintă grafic extincţiile obţinute pe ordonată, iar pe abscisă *mU/ml*. Valoarea *E*/30 *s* se interpolează la grafic, obţinîndu-se valorile activităţii enzimatice în *mU/ml*.

Valori normale: 1900—3800 *mU/ml*.

Observaţii. Recent O. Bîrzu şi colab. au modificat procedeul lui Ellman folosind ca substrat butiriltiocolina şi fotometrînd la 412 *nm* complexul colorat format de DTNB cu tiocolina eliberată din substrat sub acţiunea enzimei după o incubare de 10 minute la 25°C. Singurii reactivi necesari sînt: 1) *Substratul de butiriltiocolină* 6,6 *mM*. (Se dizolvă butiriltiocolină în tampon fosfat 0,05 *M*, *pH* 7,7 în proporţie de 2 *mg/ml*.) Se păstrează 7 zile la +4°C.

Întrucît se folosesc doar mici cantităţi pentru o reacţie, substratul se va prepara în cantităţi reduse. 2) *Reactiv DTNB-fosfat-etanol.* Se dizolvă 20 *mg* ditiobisnitrobenzen în 120 *ml* tampon fosfat 0,05 *M*, *pH* 7—7,4. Se adaugă 125 *ml* etanol 95°. Se ajustează *pH* la 7,4—7,6 şi se completează la 250 *ml* cu tampon fosfat.

Conform acestui procedeu 0,02 *ml* (20 µ*l*) din serul de analizat diluat 1/10 se incubează cu 0,2 *ml* substrat butiriltiocolină la 25°C timp de 10 minute, după care se adaugă 2 *ml* soluţie DTNB-fosfat-etanol. Ca martor (un singur martor pentru o serie de analize) se foloseşte o eprubetă conţinînd 0,2 *ml* substrat incubat în paralel cu probele şi în care serul diluat 1/10 (20 µ*l*) se introduce abia după 10 minute sau mai exact după adausul celor 2 *ml* reactiv DTNB-fosfat-etanol. Extincţiile probelor se citesc în cuve de 1 *cm* la 405 *nm* faţă de martor.

Pentru calcul se foloseşte următoarea formulă:

$$E_{405} \times 8.1 = \text{unităţi colinesterază}/ml \text{ ser.}$$

Scanned with OKEN Scanner

O unitate reprezintă activitatea enzimatică care hidrolizează 1 micromol substrat pe timp de un minut la 25°C.

Valorile normale sînt de 3—8 *U/ml* ser.

BIBLIOGRAFIE

Ellman, G. L., Courtney, K. O., Andres, D. W., Eatherstem, R. M., Biochem. Pharmacol., 1961, *7*, 88. „Biochemica-Test-Combinations, Cholinesterase", Boehringer Mannheim GMBH, 1973. Bîrzu, O., Gorun V., Proinov, I., Ungureanu, I., Anal. Biochem. (sub tipar).

8.3.2. METODA COLORIMETRICĂ A LUI DE LA HUERGA ŞI COLAB.

Principiu. Se incubează serul de analizat cu un substrat conţinînd acetilcolină în exces şi se apreciază cantitatea de acetilcolină hidrolizată de 1 *ml* ser la 37°C pe timp de o oră. Acetilcolina nehidrolizată după o oră de incubare reacţionează cu hidroxilamina, producînd acidul hidroxamic care apoi în mediu acid (împreună cu ionii ferici) formează un complex solubil roşu purpuriu. Diferenţa între acetilcolina introdusă în reacţie şi cea nehidrolizată reprezintă cantitatea de substrat transformată sub acţiunea enzimei din ser.

Reactivi. 1) Soluţie tampon: 10,3 *g* medinal se solvă în 300 *ml* apă distilată, adăugîndu-se apoi încet 60 *ml* HCl 0,1 N. În timp ce soluţia se încălzeşte şi se amestecă, se adaugă 5,3 *g* bicarbonat de sodiu anhidru, apoi, la temperatura camerei, se aduce la 500 *ml*. Soluţia are un *pH* de aproximativ 8,5 şi se păstrează la frigider timp de două luni. *2*) Amestec de săruri: 4,2 $MgCl_2$ anhidră (sau 9 *g* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) şi 0,2 *g* KCl se solvă în 100 *ml* apă. *3*) Substrat de acetilcolină (bromhidrat sau clorhidrat) 11,3 *g* la 100 *ml* H_2O. Se păstrează la frigider. *4*) Amestec de incubare se prepară proaspăt înainte de folosire, amestecîndu-se 8 părţi de soluţie tampon (reactiv 1) cu o parte acetilcolină (reactiv 3) şi o parte amestec de săruri (reactiv 2). *5*) Soluţie clorhidrat de hidroxilamină 14%. Se păstrează la frigider 10—14 zile. *6*) NaOH 14%. *7*) Hidroxilamină alcalină: se amestecă în părţi egale reactivii 5 şi 6 înainte de utilizare. *8*) Soluţie de clorură ferică: 10 *g* clorură ferică ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) se solvă în 1000 *ml* HCl, 0,02 *N*. *9*) HCl 1 *N*. (Nu e nevoie ca soluţia să fie titrată şi se obţine prin amestecarea unei părţi de HCl concentrat cu 9 părţi apă distilată).

Tehnica. La 0,2 *ml* ser de analizat se adaugă 2 *ml* amestec de incubare conţinînd substrat de acetilcolină (reactiv 4) încălzit în prealabil la 37°C. Se prepară o probă de control în care în loc de ser se pipetează 0,2 *ml* apă distilată. Se lasă pe baie de apă la 37°C timp

Scanned with OKEN Scanner

de o oră. Se adaugă apoi 2 *ml* hidroxilamină alcalină (reactiv 7) şi se agită, iar după un interval de cel puţin un minut se adaugă 6 *ml* acid clorhidric 1 *N* şi se amestecă bine. Se iau apoi 0,5 *ml* din acest amestec şi se adaugă la 10 *ml* soluţie de clorură ferică (reactiv 8). Se centrifughează 10 minute la 3000 turaţii pentru a se asigura o bună transparenţă, iar intensitatea culorii purpurii în proba de control şi în proba conţinînd ser se determină prin fotometrare la 540 *nm* faţă de o probă în alb (0,5 *ml* HCl 1 *N* + 10 *ml* soluţie clorură ferică). Valorile acetilcolinei rămase se citesc după o curbă de calibrare, alcătuită cu ajutorul unor soluţii conţinînd acetilcolină de la 20 la 100 micromoli într-un volum de 2,2 *ml*. (Avîndu-se în vedere că greutatea moleculară a clorhidratului de acetilcolină este 181, o cantitate de 18,1 *mg* va corespunde la 100 micromoli). La cei 2,2 *ml* soluţie de acetilcolină de concentraţii variate se adaugă apoi 2 *ml* clorhidrat de hidroxilamină alcalină şi se procedează în continuare pentru obţinerea reacţiei de culoare.

Calcul. După obţinerea din curbă a cantităţilor de acetilcolină (micromoli) în proba de control şi în proba de analizat se face diferenţa între aceste două valori obţinîndu-se numărul de micromoli de acetilcolină hidrolizată în proba de analizat. Înmulţindu-se această valoare cu 5 (0,2 *ml* × 5 = 1 *ml*) se obţine cantitatea de acetilcolină hidrolizată de 1 *ml* ser pe timp de o oră.

Valori normale: 180—280 μ*Moli/ml/oră.*

Observaţii. La prepararea amestecului de săruri (reactiv 2) în locul clorurii de magneziu se poate folosi sulfatul de magneziu (5,307 *mg* $MgSO_4$ siccum sau 10,227 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$).

BIBLIOGRAFIE

De la Huerga, J., Yesinick, C., Popper, H., Am. J. Clin. Path. 1952, 22, 1126.

8.3.3. METODA SPECTROFOTOMETRICĂ (KALLOW ŞI LINDSAY)

Principiul metodei se bazează pe faptul că pseudocolinesteraza hidrolizează nu numai acetilcolina, ci şi alţi esteri ai colinei, între care benzoil-colina. Întrucît benzoil-colina absoarbe la 240 *nm*, în timp ce produşii de liză, şi anume benzoatul şi colina, nu absorb, scăderea densităţii optice la 240 *nm* (Δ*E*) constituie o măsură a activităţii enzimatice.

Reactivi. 1) Soluţie tampon de fosfaţi *pH* 7,4 (75,84 g Na_2HPO_4 anhidru şi 18,156 g KH_2PO_4 anhidru dizolvat în 10 litri de apă).

Scanned with OKEN Scanner

2) Clorhidrat de benzoil-colină 10^{-4} *M* (2,47 *mg* în 100 *ml* tampon fosfat). Se prepară proaspătă înainte de lucru fiind utilizabilă cam 8 ore de la preparare. De notat că benzoil-colina este higroscopică, astfel încît substanţa va fi ţinută în exicator.

Procedeu. Serul de analizat se diluează 1 : 100 înainte de utilizare cu tampon de fosfat. Pentru determinarea activităţii enzimatice se amestecă 1 *ml* ser diluat cu 1 *ml* substrat benzoil-colină direct în cuva de quarţ a spectrofotometrului (grosimea stratului de 10 *mm*). Pentru orientare e bine de ştiut că o soluţie de benzoil-colină 5×10^{-5} *M* (soluţie substrat diluată pe jumătate) prezintă la 240 *nm* o extincţie de cca 0,480. Pentru eliminarea extincţiei date de ser se foloseşte un martor alcătuit din ser diluat 1 : 200 cu tampon, cu ajutorul căruia se stabileşte punctul 0. Se măsoară apoi scăderea densităţii optice (ΔE) notîndu-se valorile înregistrate în minutele 1 şi 4 de la efectuarea amestecului dintre ser şi substrat. Reacţia va decurge la o temperatură de cca 26°C. Valorile ΔE pe timp de 3 minute la 26°C pot fi transformate în $\mu Moli$ acetilcolină hidrolizată la 37°C de 1 *ml* ser, pe timp de o oră, după formula propusă de Kallow.

$$2422 \times \Delta E - 9{,}71 = \mu Mol \text{ acetilcolină hidrolizată}/ml/\text{oră}$$

În acest fel, valorile obţinute prin metoda spectrofotometrică pot fi comparabile cu cele obţinute prin metoda precedentă.

BIBLIOGRAFIE

Kallow, W., Lindsay, H. A., Canad J. Biochem. Physiol., 1955, *33*, 5568.

Interpretarea rezultatelor. Întrucît enzima este produsă de ficat şi secretată activ în plasmă, nivelul ei orientează asupra funcţiei proteosintetice a ficatului.

Pseudocolinesteraza serică scade în intoxicaţii cu organofosforice (unele insecticide) în denutriţia gravă şi în afecţiuni hepatice care alterează funcţia proteosintetică a ficatului (ciroza). Urmărirea pseudocolinesterazei are o valoare diagnostică şi pentru urmărirea eficacităţii terapiei. Creşterea valorilor în cursul terapiei indică un prognostic favorabil, în timp ce scăderea progresivă a enzimei denotă evoluţia spre atrofie.

Valori crescute ale pseudocolinesterazei se notează în perioada de vindecare a unei hepatite şi în sindromul nefrotic (exagerarea funcţiei proteosintetice a ficatului). O activitate crescută a acestei enzime în ser se observă şi la obezi, diabetici şi la cei cu hipertrigliceridemie endogenă (hiperlipemie tip II—b, III şi IV). În hipertiroidismul fără

Scanned with OKEN Scanner

denutriţie proteică, valorile enzimei sînt crescute (aproximativ +30%), pe cînd în hipotiroidism, valorile scad cu aproximativ 30%.

S-au descris subiecţi cu pseudocolinesterază atipică care diferă faţă de enzima normală prin rezistenţa crescută la unii inhibitori cum ar fi dibucaina sau fluorul. Pseudocolinesteraza atipică are o capacitate redusă de hidroliză a succinilcolinei (suxamotoniu) un preparat folosit în anestezie ca miorelaxant. Subiecţii prezentînd această anomalie familială a enzimei fac apnee prelungită în cazul administrării de succinilcolină.

Pentru detalii recomandăm monografia lui Goedde—Doenicke şi Altland *Pseudocholinesterasen*, apărută în 1967 în Editura Springer.

8.4. | Determinarea activităţii fosfatazelor

Fosfatazele determinate în laboratorul clinic sînt fosfomonoesteraze nespecifice care catalizează hidroliza unor diverşi esteri organici ai fosfatului (beta-glicerofosfat, fenilfosfat disodic, p-nitrofenilfosfat, fenolftaleinfosfat, alfa şi beta-naftilfosfat etc.). Termenii de *fosfatază acidă* respectiv *fosfatază alcalină* se referă doar la acel *pH* la care enzima prezintă o activitate maximală. Acesta diferă după natura substratului fiind însă în jur de *pH* 4,9 pentru fosfatazele acide şi *pH* 10,0 pentru fosfatazele alcaline.

Fosfatazele alcaline se produc în celulele osteoblastice ale oaselor, în celulele hepatice şi ale canaliculelor biliare precum şi în intestin, rinichi şi placentă.

Fosfatazele acide îşi au originea în plăcuţele sanguine în eritrocite şi în prostată. Aceasta din urmă creşte la bolnavii cu carcinom de prostată şi este inhibată selectiv de L-tartrat. Mici cantităţi de fosfatază acidă se găsesc şi în oase, rinichi, ficat şi glanda mamară.

8.4.1. | DETERMINAREA FOSFATAZELOR ALCALINE ŞI ACIDE CU METODA KING—ARMSTRONG

Principiu. Sub acţiunea fosfatazelor, fenil-fosfatul disodic este hidrolizat, iar fenolul eliberat dă o reacţie de culoare cu reactivul Folin—Ciocâlteu.

În funcţie de tamponul folosit (respectiv de *pH*) se poate doza atît fosfataza alcalină cît şi fosfataza acidă.

Reactivi. 1) Tampon alcalin (pentru fosfataza alcalină): Medinal 22,6 *g* se solvă în 700 *ml* apă distilată. Se ajustează *pH*-ul la 9. Se aduce la 1000 *ml* cu apă distilată. Se păstrează la +4°. 2) *Tampon acid* (pentru fosfataza acidă): se dizolvă 37,8 g acid citric în 300 *ml*

Scanned with OKEN Scanner

H_2O. Se adaugă 360 *ml NaOH* 0,1 *N* şi 200 *ml* HCl 0,1 *N*. Se ajustează *pH*-ul la 4,9. Se completează cu apă distilată la 1000 *ml*. Se păstrează la +4°C Se controlează periodic *pH*-ul tampoanelor. *3) Soluţie tartrat 0,2 M*: se dizolvă acid tartric 3 *g* în 50 *ml* H_2O. Se adaugă aproximativ 35 *ml* NaOH 1 *N* pentru a se ajusta *pH*-ul la 4,9. Se completează cu apă distilată pînă la 100 *ml*. *4) Substrat.* Se dizolvă 2,18 *g* fenilfosfat disodic în 1000 *ml* H_2O, aducîndu-se la fierbere timp de cîteva minute. Se răceşte apoi şi se păstrează la +4°C. *5) Carbonat de sodiu* (Na_2CO_3 siccum) 20 g în 100 *ml* H_2O. *6) Soluţie etalon de fenol*, 1 *mg/ml* (1 g fenol se dizolvă în 1000 *ml* HCl 0,1 *N*). Se păstrează la +4°C. *7) Reactiv Folin-Ciocâlteu* (vezi pag. 115). Se diluează 1/3 înainte de utilizare.

	Fosfataze alcaline		*Fosfataze acide totale*		*Fosfataza acidă (tartrat rezistentă)*	
	Proba (ml)	*Control (ml)*	*Proba (ml)*	*Control (ml)*	*Proba (ml)*	*Control (ml)*
Tampon alcalin	2	2	—	—	—	—
Tampon acid	—	—	2	2	1,6	1,6
Substrat	2	2	2	2	2	2
Tartrat	—	—	—	—	0,4	0,4
Ser	0,2	—	0,2	—	0,2	—
Incubare la 37°C	15 min		60 min		60 min	
Ser	—	0,2	—	0,2	—	0,2
Reactiv Folin-Ciocâlteu dil 1/3	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Centrifugare sau filtrare						
Filtrat	4	4	4	4	4	4
Na_2CO_3 20%	1	1	1	1	1	1

Se ţin la 37°C timp de 20 minute şi se citesc extincţiile la 700 *nm* faţă de o probă în alb, alcătuită din 2,8 *ml* apă distilată 1,2 *ml* reactiv Folin-Ciocâlteu diluat 1/3 şi 1 *ml*. Na_2CO_3 20%. Se face diferenţa între probă şi control (lipsa activităţii enzimatice) şi se obţin valorile în *mg* ale fenolului eliberat în fiecare probă prin raportarea la o curbă de calibrare.

Trasarea curbei de calibrare se face pornind de la soluţia etalon (reactiv 6) diluată de 10 ori (0,1 *mg* fenol/*ml*). Din această soluţie di-

Scanned with OKEN Scanner

luată se pipetează într-o serie de eprubete volume de la 0,1 la 1 *ml* corespunzînd la 0,01—0,1 *mg* fenol). Se completează la 2 *ml* cu apă distilată. Se adaugă 2 *ml* reactiv Folin-Ciocâlteu (volum final 4 *ml*). Se adaugă 1 *ml* Na_2CO_3, 20%. Se incubează 20 minute la 37°C și se citește la 700 *nm* față de o probă în alb alcătuită din 2 *ml* apă distilată, 2 *ml* reactiv Folin-Ciocâlteu și 1 *ml* Na_2CO_3 20%.

Calcul. În cazul fosfatazelor alcaline unitatea King-Armstrong (KA) corespunde unei activități enzimatice care duce la eliberarea de 1 *mg* fenol în decurs de 15 minute la 37° de către 100 *ml* ser. Pentru fosfatazele acide activitatea este raportată la 60 minute de incubare. Pentru obținerea rezultatelor în unități K.A. valorile de *mg* fenol eliberat în fiecare probă citite pe curbă se înmulțesc cu 760. De exemplu extincția obținută de o probă (probă-control) corespunde pe curbă la 0,02 *mg* fenol. Activitatea enzimatică va fi de 0,02 × 760 = 15,2 unități King.

Valorile normale ale fosfatazei alcaline sînt de 4—12 unități King la adult, admițîndu-se valori de pînă la 20 unități King la copii. Fosfatazele alcaline cresc în rahitism, boala lui Paget, hiperparatiroidism și în general în afecțiunile osoase însoțite de o reacție osteoblastică. Creșteri ale fosfatazelor alcaline de origine hepatobiliară se întîlnesc în caz de colestază. Se poate o diferențiere a fosfatazelor de origine osoasă sau de origine hepatobiliară prin electroforeză și reacție histochimică pe lamă (diferențiere de izoenzime). Fosfatazele acide sînt de 1—3 unități King și cresc în cancerul prostatei și în unele neoplasme ale glandei mamare. În cancer al prostatei creșterea interesează în special fracțiunea tartrat-inhibabilă, (diferența între fosfataza acidă totală și fosfataza acidă tartrat rezistentă) și care la normali este de 0,55 unități.

BIBLIOGRAFIE

King, E. S., Armstrong, A. R., J. Canad. Med. Ass., 1934, *31*, 376.

8.4.2. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ALCALINE PRIN METODA BODANSKY

Principiu. Se dozează fosfatul anorganic eliberat din beta-glicerofosfat de sodiu, în timp de o oră la 37°C, raportat la 100 *ml* ser.

Reactivi. 1) Soluție acid tricloracetic 5%. *2*) Soluție substrat tampon: 2,5 *g* beta-glicerofosfat de Na și 2,12 dietilbarbiturat de Na, se dizolvă în apă și se completează la 500 *ml*. *3*) Soluție standard fosfat (se prepară soluție stoc ca la dozarea fosfatului anorganic seric prin metoda Briggs). Se diluează soluția stoc 1 *ml* și apă ad 50 *ml*

Scanned with OKEN Scanner

(soluţia diluată conţine 2 µg P/*ml*). *4*) Reactivii de la dozarea fosfatului anorganic seric prin metoda cu acid ascorbic (vezi pag. 251).

Tehnica. Se pregătesc două eprubete de centrifugă:

Reactivi	*Probă*	*Martor*
Ser (*ml*)	0,1	0,1
Sol. ac. tricloracetic 5% (*ml*)	—	0,9
Substrat tampon (*ml*)	1,0	1,0
Se incubează timp de o oră la 37°C, apoi se adaugă:		
Sol. ac. tricloracetic 5% (*ml*)	0,9	—
Se centrifughează 10 min, la 3000 rot/min, apoi se iau:		
Supernatant (*ml*)	1,5	1,5
Molibdat de NH_4 (*ml*)	0,6	0,6
Apă distilată (*ml*)	0,8	0,8
Ac. ascorbic 1,5% (*ml*)	0,1	0,1

Se agită, apoi după 30 minute se citesc extincţiile probei şi ale martorului, la 600 *nm* (filtru roşu), în cuvă de 1 *cm* faţă de o probă în alb care conţine 2,3 *ml* apă, 0,6 *ml* molibdat şi 0,1 *ml* acid ascorbic 1,5%. Se face de asemenea o probă cu 1 *ml* soluţie standard fosfat, 1,3 *ml* apă, 0,6 *ml* molibdat de amoniu şi 0,1 *ml* acid ascorbic 1,5%.

Calcul. Unitatea Bodansky corespunde unei activităţi enzimatice care duce la eliberarea de 1 *mg* fosfat anorganic în timp de o oră la 37°C de către 100 *ml* ser. La calcul se va ţine cont de concentraţia standardului (2 µg fosfor) şi de faptul că determinările de fosfor corespund unei cantităţi de 0,075 *ml* ser (1,5 *ml* supernatant). În consecinţă:

$$mg\ \text{P}/100\ ml\ \text{ser/oră (unităţi Bodansky)} = \frac{E\ \text{probă} - E\ \text{martor}}{E\ \text{standard}} \times 2 \times \frac{100}{1000 \cdot 0{,}075} =$$

$$= \frac{E\ \text{probă} - E\ \text{martor}}{E\ \text{standard}} \cdot 6{,}66$$

Valori normale: adulţi 2—6 u. Bodansky
copii 6—16 u. Bodansky

BIBLIOGRAFIE

Bodansky, A., J. Biol. Chem., 120 (1937) 167.

8.4.3. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII FOSFATAZEI ALCALINE CU PARANITROFENILFOSFAT (BESSEY—LOWRY MODIFICATĂ)

Principiu. Prin acţiunea fosfatazelor asupra p-nitrofenilfosfatului, este pus în libertate p-nitrofenolul intens colorat în galben, în mediu alcalin.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi. *1*) Soluţie substrat-tampon (p-nitrofenilfosfat $5{,}5 \cdot 10^{-3}$ *M*, tampon glicocol 0,05 *M*, *pH* 10,5): se dizolvă 375 *mg* glicocol, 10 *mg* $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ şi 165 *mg* p-nitrofenilfosfat, sare de sodiu, în 42 *ml* NaOH 0,1 *N*, apoi se completează cu apă la 100 *ml*. *pH*-ul soluţiei trebuie să fie 10,5. Se păstrează o săptămînă la +4°C. *2*) NaOH 0,02 *N*.

Tehnica. Se pregătesc două eprubete astfel:

Reactivi	*Probă*	*Martor*
Substrat-tampon (*ml*)	1,0	1,0
Ser (*ml*)	0,1	—

Se agită, se incubează 30 min la 37°C, apoi se adaugă:

NaOH 0,02 n (*ml*)	10,0	10,0
Ser (*ml*)	—	0,1

Se agită, apoi se citeşte extincţia probei faţă de martor, la 405 *nm*. Dacă densitatea optică este peste 0,780 se repetă determinarea luînd 0,1 *ml* ser diluat 1/4 cu soluţie NaCl 0,9%, iar la calcul se înmulţeşte rezultatul cu 4.

Calcul. Rezultatele se exprimă în *mU/ml* şi se calculează după formula:

$$mU/ml = 200 \cdot E_{405}$$

Valori normale: la copii 38—138 *mU/ml*, la adulţi 20—48 *mU/ml*. Variaţii patologice au fost descrise anterior (vezi metoda King-Armstrong).

Observaţii. Metoda poate fi adaptată la scară ultramicroanalitică reducînd volumele tuturor reactivilor de 10 ori (adică se utilizează 10 *µl* ser).

Activitatea fosfatazei alcaline serice este destul de stabilă, serul putînd fi păstrat timp de luni de zile fără aş pierde activitatea enzimatică.

În cazul în care nu se poate lucra exact la 405 *nm* se va folosi o curbă de etalonare cu p-nitrofenol (vezi mai departe).

În metoda originală Bessey-Lowry exprimarea rezultatelor se face în unităţi Bessey-Lowry, o astfel de unitate corespunzînd activităţii enzimatice care duce la eliberarea de 1 micromol p-nitrofenol (0,1391 *mg*) în decurs de o oră de către 1 *ml ser*. Valorile normale în unităţi Bessey-Lowry sînt de 0,8—2,3 la adult şi de 3,4—9,1 la copil. Pentru transformarea unităţilor Bessey-Lowry în unităţi internaţionale (micromoli/min/litru) unităţile Bessey-Lowry se înmulţesc cu factorul de conversiune $\frac{1000}{60}$ adică 16,7.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Bessey, O. A., Lowry, O. H., Brock, M. J., J. Biol. Chem., 164 (1946) 321. Richterich, R., *Chimie clinique, théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

8.4.4. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII FOSFATAZEI ACIDE METODA BODANSKY MODIFICATĂ

Principiu. Sub acţiunea fosfatazei acide la *pH* 5 se eliberează fosfat anorganic din substratul de betaglicerofosfat.

Reactivi. 1) Soluţie substrat: 5 g beta-glicerofosfat de Na şi apă bidistilată ad 1000 *ml*. *2*) HCl 0,5 *N*. *3*) Soluţie substrat-tampon: 6,93 *ml* soluţie substrat se amestecă cu 0,27 *ml* soluţie HCl 0,5 *N*. *4*) Soluţie acid tricloracetic 10%. *5*) Toţi reactivii necesari pentru dozarea fosfatului anorganic, metoda cu acid ascorbic (vezi pag. 251). *6*) Soluţie standard de fosfat anorganic conţinînd 2 µg/*ml* (vezi fosfataza alcalină pag. 301).

Tehnica. Se pregătesc trei tuburi de centrifugă:

Reactivi	*Probă*	*Martor*	*Standard*
Substrat (*ml*)	1,8	1,8	—
Ser (*ml*)	0,2	0,2	—
Apă distilată (*ml*)	—	—	1
Soluţie standard (*ml*)	—	—	1
Acid tricloractetic 10%	—	0,5	0,5
Incubare 2 ore la 37°C			
Acid tricloracetic 10%	0,5	—	—
Se centrifughează 10 minute la 3000 rot/min.			
Supernatant (*ml*)	2,0	2,0	2,0
Molibdat de NH_4 (*ml*)	0,6	0,6	0,6
Apă (*ml*)	0,3	0,3	0,3
Acid ascorbic 1,5% (*ml*)	0,1	0,1	0,1

Se agită, apoi se citesc extincţiile faţă de o probă în alb, ce conţine 2,3 *ml* apă, 0,6 *ml* molibdat şi 0,1 *ml* acid ascorbic, la 600 *nm* (filtru roşu) în cuvă de 1 *cm*.

Calcul. Se face după acelaşi principiu ca şi în cazul fosfatazei alcaline. Se va ţine însă cont că incubarea s-a făcut pe timp de 2 ore şi că diluarea probei şi standardului s-a făcut în acelaşi mod astfel încît fosfatul dozat în probă poate fi raportat la 0,2 *ml* ser (şi nu la 0,16 *ml* cît ar reieşi din calculul diluţiei). Pentru a raporta activitatea la 100 *ml* ser şi la o oră se aplică formula:

$$\text{Unităţi Bodansky} = \frac{E \text{ probei} - E \text{ martor}}{E \text{ standard}} \times 2 \times \frac{100}{1000 \times 0{,}2 \times 2}$$

$$\text{Unităţi Bodansky} = \frac{E \text{ probei} - E \text{ martor}}{E \text{ standard}} \times 0{,}5$$

Valori normale: 0,1—0,9 u. Bodansky

Observaţii. Atît în cazul fosfatazei alcaline cît şi în cazul fosfatazei acide valorile fosforului anorganic eliberat pot fi obţinute dintr-o curbă de calibrare preparată cu diluţii corespunzătoare de fosfor anorganic (vezi pag. 252).

8.4.5. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII FOSFATAZEI ACIDE CU PARANITROFENILFOSFAT

Principiu. Se determină p-nitrofenolul eliberat din substrat în prezenţa şi în absenţa tartratului de sodiu. Activitatea inhibată de tartrat corespunde activităţii fosfatazei acide de origine prostatică.

Reactivi. 1) Tampon citrat 50 *mM*, *pH* 4,8 (vezi prepararea la soluţiile tampon). *2*) Soluţie substrat (p-nitrofenilfosfat, sare sodică 5,5 *mM*) tamponat (tampon citrat 50 *mM*, *pH* 4,8): se dizolvă 0,41 *g* acid citric, 1,125 *g* citrat de sodiu şi 165 *mg* p-nitrofenilfosfat, sare de sodiu, în 100 *ml* apă bidistilată. *3*) Soluţie tartrat de Na 0,2 *M* (46 *g*/1000 *ml*). *4*) Soluţie NaOH 0,02 *N*.

Tehnica. Se pregătesc trei eprubete astfel:

Reactivi	*Probă în alb*	*Proba 1*	*Proba 2*
Sol. substrat tamponat (*ml*)	1,0	1,0	1,0
Sol. tartrat (*ml*)	—	—	0,1
Ser (*ml*)	—	0,2	0,2
Se amestecă, se incubează la 37°C timp de 30 *min*, se adaugă:			
NaOH 0,02 *n* (*ml*)	10,0	10,0	10,0
Ser (*ml*)	0,2	—	—

Se citesc extincţiile probelor 1 şi 2 faţă de proba în alb la 405 *nm* (linia Hg). Dacă densităţile optice sînt peste 0,760 se amestecă 0,2 *ml* ser cu 0,6 *ml* NaCl 0,9% şi se repetă determinarea cu 0,2 *ml* din această diluţie. La calcul se multiplică rezultatul cu 4.

Calcul. Activitate totală $= 101 \cdot E_{\text{probă 1}}(mU/ml)$
Activitatea fosfatazei acide prostatice $= 101 \cdot (E_{\text{probă 1}} - E_{\text{probă 2}}) =$
$= mU/ml.$

Dacă se măsoară extincţiile la linia mercurului 405 *nm* se poate utiliza tabelul de mai jos (Tabel 18).

Valori normale: activitatea totală: pînă la 11 *mU/ml.*

Activitate fosfatazică acidă prostatică: pînă la 4 *mU/ml.*

Variaţiile patologice au fost descrise anterior (vezi metoda King-Armstrong pag. 301).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL

CORESPONDENȚA ÎNTRE EXTINCȚIA (*E*) LA 405 *nm* ȘI ACTIVITATEA FOSFATAZEI ACIDE ÎN *mU/ml*.

E	*mU/ml*	*E*	*mU/ml*	*E*	*mU/ml*
0,010	1,0	0,125	12,6	0,360	36,4
15	1,5	130	13,1	380	38,4
20	2,0	135	13,6	0,400	40,4
25	2,5	140	14,1	420	42,4
30	3,0	145	14,6	440	44,4
35	3,5	150	15,2	460	46,5
40	4,0	155	15,7	480	48,5
45	4,5	160	16,2	0,500	50,5
50	5,1	165	16,7	520	52,5
55	5,6	170	17,2	540	54,5
60	6,1	175	17,7	560	56,6
65	6,6	180	18,2	580	58,6
70	7,1	185	18,7	0,600	60,6
75	7,6	190	19,2	620	62,6
80	8,1	195	19,7	640	64,6
85	8,6	0,200	20,2	660	66,7
90	9,1	220	22,2	680	68,7
95	9,6	240	24,2	0,700	70,7
0,100	10,1	260	26,3	720	72,7
105	10,6	280	28,3	740	74,7
110	11,1	0,300	30,3	760	76,8
115	11,6	320	32,3		
0,120	12,1	0,340	34,3		

Observații. Activitatea enzimei descreşte rapid la temperatura camerei, de aceea determinarea trebuie să se facă imediat după recoltarea sîngelui. Pe ser se obțin valori mai mari decît în plasmă.

BIBLIOGRAFIE

Biochemica-Test-Combinations, Boehringer Mannheim GMBH, 1973.

8.4.6. CURBA DE CALIBRARE PENTRU DETERMINAREA FOSFATAZELOR CU PARANITROFENILFOSFAT

Principiu. Se amestecă cantități crescînde dintr-o soluție de p-nitrofenol cu hidroxid de sodiu. Intensitatea culorii p-nitrofenolatului în mediu alcalin, se măsoară la 400—420 *nm*. Extincțiile obținute sînt date ca *mU/ml* activitate fosfatazică.

Reactivi. *1*) Soluție NaOH 0,02 *N*. *2*) Soluție p-nitrofenol 0,5 *mM*.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica. Se pregătesc 6 eprubete în care se adaugă volumul indicat din soluţia de p-nitrofenol şi apoi cîte 10 *ml* NaOH:

Eprubeta nr.	*ml. sol. p-nitrofenol*	*Fosfataza alcalină mU/ml*	*Activitate fosfatazică acidă mU/ml*
1	0,10	18,3	9,3
2	0,20	36,3	18,3
3	0,40	71,2	35,9
4	0,60	105	52,9
5	0,80	137	69,2
6	1,00	168	85,0

Se agită şi se citesc extincţiile faţă de o probă în alb cu NaOH 0,02 *N*, la 400—420 *nm* (filtru albastru), în cuvă de 1 *cm*. Se reprezintă grafic extincţiile în funcţie de *mU/ml*.

BIBLIOGRAFIE

„Biochemica-Test-Combinations", Boehringen, Mannheim GMBH, 1973.

8.4.7. TRANSFORMAREA DIVERSELOR UNITĂŢI DE ACTIVITATE A FOSFATAZELOR ÎN UNITĂŢI INTERNAŢIONALE (mU/ml)

Din cele relatate mai sus s-a văzut că în determinarea activităţii fosfatazelor se pot utiliza diverse substraturi, iar pentru exprimarea rezultatelor se folosesc diverse unităţi. Pentru uşurarea comparării rezultatelor s-au făcut încercări de transformare a acestor unităţi clinice în unităţi internaţionale. În tabelul 3 de la partea generală s-au arătat factorii de conversiune în unităţi internaţionale pentru diverse activităţi enzimatice inclusiv fosfatazele alcaline şi acide. De notat însă că după Sommer, citat de Richterich aceşti factori de conversiune nu corespund cu datele obţinute prin dozări paralele cu diversele metode şi calcularea pe baze empirice a factorilor respectivi de conversiune. Astfel în cazul fosfatazei alcaline pentru transformarea unităţilor Bodanski în *mU/ml* factorul de conversiune găsit de Sommer nu este 5,35 ci 8,3, iar în cazul metodei King-Armstrong factorul de conversiune nu este 7,1 ci 4. Factorul teoretic de conversiune al unităţilor Bessey-Lowry în *mU/ml* este verificat ca fiind 16,7.

BIBLIOGRAFIE

Schmidt, E., Schmidt, F. W., Enzym-Fibel., C. F. Boehringer GMBH Mannheim, 1966. Richterich, R., *Chimie clinique, théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

Scanned with OKEN Scanner

8.5. | Determinarea activităţii aldolazei

Principiu. Triozofosfaţii, rezultaţi din scindarea fructozo-1,6-difosfatului prin acţiunea aldolazei, sînt legaţi cu hidrazina. După deproteinizare cu acid tricloracetic ei sînt hidrolizaţi cu NaOH. Triozele libere sînt tratate cu 2,4-dinitrofenilhidrazină, formînd metilglioxal-2,4-dinitrofenilosazona şi 2,4-dinitrofenilhidrazona acidului piruvic. Aceşti compuşi dizolvaţi în alcalii au o culoare roşie cu maximum de absorbţie între 535—540 *nm*.

Reactivi. 1) Soluţie substrat (0,1 *M* fructozo-1,6-difosfat): într-un tub de centrifugă se suspendă 3 *g* fructozo-1,6-difosfat, sare de bariu, în cca 20 *ml* apă distilată şi se adaugă HCl 2 *n* cu picătura pînă cînd se obţine solubilizarea completă. Se dizolvă 2 *g* sulfat de Na în 5 *ml* apă şi se adaugă la soluţia precedentă. Se agită, apoi se centrifughează, îndepărtînd precipitatul de $BaSO_4$. Se aduce supernatantul (de culoare gălbuie) la *pH* 7,4 prin adaus de NaOH 1 *n*. Se diluează soluţia la 30 *ml* cu apă bidistilată. *2*) Soluţie tampon collidină (0,1 *M*, *pH* 7,4): se dizolvă 4,84 *g* (= 5,28 *ml*) collidină în apă distilată şi se aduce la 100 *ml*. La 25 *ml* din această soluţie stoc se adaugă 45 *ml* soluţie HCl 0,1 *n* şi se diluează la 100 *ml* cu apă distilată. Dacă este necesar se ajustează *pH*-ul la 7,4 cu HCl sau NaOH. *3*) Soluţie hidrazină 0,56 *M*: se dizolvă 9,08 *g* sulfat de hidrazină în cca 70 *ml* apă bidistilată şi se adaugă 5 *g* NaOH solid. Se adaugă NaOH 10 *n* pînă la *pH* 7,4 apoi se diluează cu apă bidistilată la 100 *ml*. *4*) Soluţie 2,4-dinitrofenilhidrazină (0,1%): se amestecă 250 *mg* 2,4-dinitrofenilhidrazină într-un mojar cu porţiuni mici de HCl 2 *n*, se filtrează, apoi se diluează la 250 *ml* cu HCl 2 *n*. *5*) Soluţie acid tricloracetic 10%. *6*) Soluţie NaOH 0,75 *n*. *7*) Tampon collidină-hidrazină: se amestecă 100 părţi sol. 2 cu 25 părţi soluţie 3 şi 50 părţi apă distilată.

Reactivii (cu excepţia soluţiilor 5 şi 6) se păstrează în frigider la +4°C. Se reînnoiesc la 2—3 săptămîni.

Tehnica. Se utilizează numai ser nehemolizat. Se pregătesc două eprubete în felul următor:

Reactivi	*Probă*	*Martor*
Ser (*ml*)	1,00	1,00
Tampon collidină-hidrazină (*ml*)	1,75	1,75
Sol. substrat (*ml*)	0,25	—
Se incubează 60 min la 37°C, apoi se adaugă:		
Ac. tricloracetic 10% (*ml*)	3,00	3,00
Sol. substrat (*ml*)	—	0,25
Se agită, apoi se filtrează, după care se iau:		
Filtrat (*ml*)	1,00	1,00

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi	*Probă*	*Martor*
Sol. NaOH 0,75 *n* (*ml*)	0,75	0,75
Se lasă în repaus 10 *min*, la temperatura camerei, timp în care triozofosfatul este hidrolizat, apoi se adaugă:		
Sol. 2,4-dinitrofenil-hidrazină (*ml*)	1,00	1,00
Se amestecă şi se incubează 10 *min* la 37 °C, apoi se adaugă:		
Sol. NaOH 0,75 *n* (*ml*)	8,25	8,25

Se amestecă, apoi se citeşte extincţia probei faţă de martor la 540 *nm*, în cuvă de 1 *cm*, la un interval de 3—15 *min.*, după adausul ultimului reactiv. După 15 *min.* intensitatea culorii descreşte (atinge 90% din valoarea iniţială după 30 *min.*).

Calcul. Activitatea aldolazică se exprimă în unităţi Bruns, o unitate fiind egală cu 1 µ*l* fructozo-1,6-difosfat hidrolizat pe oră/*ml* ser, la 37 °C. (1 micromol fructozodifosfat (FDP) corenpunde la 340 µg FDP şi respectiv la 22,4 µ*l* FDP). Pentru a exprima activitatea aldolazică în aceste unităţi se înmulţeşte extincţia cu 37. Pentru a converti activitatea în unităţi internaţionale, adică un micromol/1 minut/1 litru ser, se multiplică valoarea obţinută anterior cu 0,61 (se obţine activitatea aldolazică exprimată în *mU/ml.*)

Valori normale: 3—8 unităţi Bruns (1,8—4,8 *UI*).

BIBLIOGRAFIE

Bergmeier, H. U., *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie GMBH, Weinheim Bergstr., 1965.

8.6. Determinarea activităţii transaminazelor (glutamico-oxalacetică, GOT, şi glutamico-piruvică, GPT)

8.6.1. METODA COLORIMETRICĂ CU 2,4-DINITROFENILHIDRAZINĂ

Principiu. Glutamico-oxalacetico-transaminaza catalizează reacţia:

L-aspartat + alfa-cetoglutarat ⇌ L-glutamat + oxaloacetat,

pe cînd glutamico-piruvico-transaminaza catalizează reacţia:

L-alanină + alfa-cetoglutarat ⇌L-glutamat + piruvat.

Prin tratarea cu 2,4-dinitrofenilhidrazină în soluţie alcalină se formează fenilhidrazonele acizilor alfa-cetoglutaric, oxalacetic şi piruvic. Pentru a nu interfera în măsurarea activităţii alfa-cetoglutaratul

Scanned with OKEN Scanner

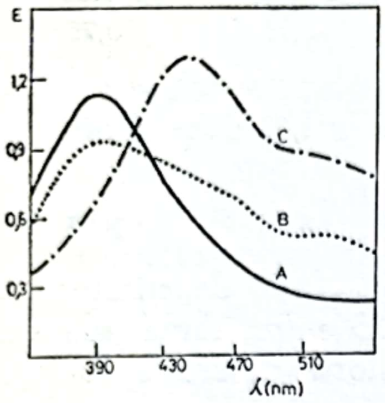


Fig. 45. Spectrele de absorbție ale soluțiilor alcaline echimoleculare ale 2-4-dinitrofenil hidrazonelor acizilor alfa-cetoglutaric (A), oxalacetic (B) și piruvic (C).

se adaugă în cantități mici, iar măsurarea colorimetrică se face la lungime de undă mare (500—550 *nm*), unde fenilhidrazona acidului alfacetoglutaric absoarbe slab (fig. 45).

Reactivi. *1*) Substrat GOT: 1,50 *g* K_2HPO_4, 0,20 *g* KH_2PO_4, 0,039 *g* alfa-cetoglutarat de Na (sau 0,030 *g* acid alfa-cetoglutaric) și 1,57 g aspartat de Na (sau 1,32 *g* acid aspartic) se dizolvă în cca. 80 *ml* apă. Se aduce *pH*-ul la 7,4 cu NaOH 0,4 *N*, apoi se completează volumul la 100 *ml* cu apă bidistilată. *2*) Substrat GPT: 1,50 *g* K_2HPO_4, 0,20 *g* KH_2PO_4, 0,030 g acid alfa-ceto-glutaric (sau 0,039 g alfa-cetoglutarat de Na) și 1,78 *g* alanină se dizolvă în cca. 80 *ml* apă, se aduce *pH*-ul la 7,4 cu NaOH 0,4 *N*, apoi se completează la 100 *ml* cu apă bidistilată. *3*) Soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină 1 *mM* în HCl 2 *M:* se dizolvă 20 *mg* dinitrofenil hidrazină în HCl *n* și se aduce volumul la 100 *ml* cu apă bidistilată. *4*) Soluție piruvat de Na 2 *mM* (22 *mg*/100 *ml* apă). *5*) Soluție NaOH 0,4 *n* (16 *g*/1000 *ml* apă).

Tehnica. Se utilizează numai ser nehemolizat. Pentru o serie de analize se face o singură probă în alb. Se pregătesc următoarele eprubete:

Reactivi	*Probe în alb*		*Probe*	
	GOT	*GPT*	*GOT*	*GPT*
Substrat GOT (*ml*)	1,0	—	1,0	—
Substrat GPT (*ml*)	—	1,0	—	1,0
Ser (*ml*)	—	—	0,2	0,2
Apă bidistilată (*ml*)	0,2	0,2	—	—

Se amestecă, se incubează la 37°C timp de 60 *min.* probele pentru GOT și timp de 30 *min.* probele pentru GPT, apoi se adaugă:

Sol. dinitrofenil-hidrazină (*ml*)	1,0	1,0	1,0	1,0

Se amestecă, se lasă în repaus la temperatura camerei 20 *min.*, apoi se adaugă:

Sol. NaOH 0,4 *n* (*ml*)	10,0	10,0	10,0	10,0

Se agită, apoi se citesc extincțiile probelor față de probele în alb corespunzătoare, după 5 *min.*, la 530—550 *nm* (546 *nm*). Dacă extincțiile sînt peste 0,260 (GOT) sau 0,375 (GPT) se amestecă 0,1 *ml* ser cu 0,9 *ml* soluție NaCl 0,9% și se repetă determinarea cu 0,2 *ml* din această diluție. Rezultatul se va multiplica cu 10.

Scanned with OKEN Scanner

Calcul. Pentru exprimarea rezultatelor în *mU/ml* se va face o curbă de calibrare cu o soluţie de piruvat în felul următor: se adaugă volume crescînde dintr-o soluţie standard de piruvat 2 *mM*, la volume descrescînde de substrat GOT şi se lasă să reacţioneze cu 2,4-dinitrofenilhidrazină. Concentraţia totală a cetoacizilor (acid piruvic + alfa-cetoglutaric) rămîne constantă, iar la *pH* alcalin intensitatea culorii hidrazonei produse este proporţională cu cantitatea de piruvat luată în lucru. Corespondenţa dintre cantitatea de piruvat şi activitatea transaminazică dată în curba de mai jos, s-a stabilit în mod comparativ cu determinări efectuate prin teste în ultraviolet. Pentru curba de calibrare se pregătesc următoarele eprubete:

Nr. eprubetei	*ml sol. piruvat*	*ml apă distilată*	*ml substrat GOT*	*mU GOT/ml*	*mU GPT/ml*
1	0,00	0,20	1,00	—	
2	0,05	0,20	0,95	10	6
3	0,10	0,20	0,90	20	13
4	0,15	0,20	0,85	32	19
5	0,20	0,20	0,80	47	28
6	0,25	0,20	0,75	67	35
7	0,30	0,20	0,70	93	46
8	0,40	0,20	0,60	—	66
9	0,50	0,20	0,50	—	99

Se amestecă, apoi se adaugă în fiecare eprubetă cîte 1 *ml* soluţie. 2,4-dinitrofenilhidrazină şi se lasă în repaus 20 *min.*, la temperatura camerei. Apoi se pipetează în fiecare eprubetă cîte 10 *ml* sol. NaOH 0,04 *n*. Se amestecă şi se citesc după 5 *min.* extincţiile probelor 2—9 faţă de proba în alb (eprubeta 1).

Valori normale.

GOT: pînă la 12 *mU/ml*
GPT: pînă la 12 *mU/ml*

Pentru interpretare vezi pagina 334 şi tabel 19.

BIBLIOGRAFIE

Bergmeyer, H. U., *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie GMBH, Weinheim/Bergstr., 1965. Biochemica-Test-Combinations, Boehringer Mannheim GMBH, 1973.

8.6.2. | METODA SPECTROFOTOMETRICĂ ÎN U.V. (TEST OPTIC)

Principiu. Se utilizează pentru măsurarea GOT (ca reacţie indicatoare) următoarea reacţie catalizată de malat-dehidrogenază:

L-aspartat + alfa-cetoglutarat → oxaloacetat + L-glutamat

$$\text{oxaloacetat} + NADH_2 \xrightarrow{\text{malat-dehidrogenază}} \text{malat} + NAD$$

Scanned with OKEN Scanner

Pentru măsurarea GPT se utilizează ca sistem indicator reacţia catalizată de lactat-dehidrogenază:

$$\text{L-alanină} + \text{alfa-cetoglutarat} \rightarrow \text{L-glutamat} + \text{piruvat}$$

$$\text{piruvat} + NADH_2 \xrightarrow{\text{lactat-dehidrogenază}} \text{lactat} + NAD$$

Condiţii de determinare. Pentru GOT: L-aspartat 36 *mM*, alfa-cetoglutarat 5,7 *mM*, trietanolamină 50 *mM*, EDTA 5 *mM*, malatdehidrogenază peste 20.000 µ*Moli/min*/litru, $NADH_2$ 107 µ*M*, *pH* 7,5 25°C, lungimea de undă 340 sau 366 *nm*, d=1 *cm*. Durata de măsurare 0,5—2 *min*.

Soluţii pentru analiză. Soluţie I: 1 parte sol. $NADH_2$ 3 *mM*, 2 părţi soluţia de malat-dehidrogenază, 2 părţi L-aspartat 200 *mM*, 12 părţi tampon trietanolamină-EDTA 50 *mM*.

Soluţia II: 1 parte soluţie alfa-cetoglutarat 200 *mM* şi 4 părţi soluţie tampon trietanolamină-EDTA 50 *mM*.

Tehnica. Se incubează timp de 5 *min*. 0,5 *ml* soluţie I cu 0,1 *ml* ser. Se controlează extincţia timp de 1 *min*., apoi se declanşează reacţia adăugînd 0,1 *ml* soluţie II. Se urmăreşte variaţia extincţiei timp de 0,5—2 *min*.

Calcul. a) La 366 *nm* se aplică formula:

$$UI = \frac{\Delta E/min}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}7}{0{,}1} \cdot 10^6 = \Delta E/min \times 2120 \ \mu Moli/min/\text{litru}$$

considerînd coeficientul milimolar de extincţie al $NADH_2$ la 366 *nm* = = 3300.

b) La 340 *nm* se aplică formula:

$$UI = \Delta E/\text{min} \times 1125 \ \mu Moli/min/\text{litru}$$

pentru o valoare a coeficientului milimolar de extincţie de 6200. Explicaţia acestor formule a fost dată la partea generală (vezi pag. 89).

Valori normale: pînă la 12 *mU/ml*.

Condiţii de determinare pentru GPT: concentraţii finale: L-alanină 31 *mM*, alfa-cetoglutarat 5,0 *mM*, lactat-dehidrogenaza peste 10.000 µ*Moli/min/litru*, $NADH_2$ 95 µ*M*, trietanolamină 50 *mM*, *pH* 7,5, EDTA 5,0 *mM*, 25°C, lungime de undă 340 sau 366 *nm*, d = 1 *cm*, durata de măsurare 0,5—2 *min*.

Soluţii pentru analiză. Soluţia I: 1 parte $NADH_2$ 3 *mM*, 2 părţi soluţie de lactat-dehidrogenază, 5 părţi soluţie L-alanină 200 *mM* şi 12 părţi tampon trietanolamină-EDTA.

Soluţia II: 1 parte soluţie alfa-cetoglutarat 200 *mM* şi 4 părţi tampon trietanolamin-EDTA.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica. Se incubează 0,5 *ml* soluţie I cu 0,2 *ml* ser, timp de 5 *min.*, apoi se controlează extincţia timp de 1 *min*, după care se declanşează reacţia enzimatică, adăugînd 0,1 *ml* soluţie II. Se urmăreşte variaţia extincţiei timp de 0,5—2 *min.*

Calcul: a) la 366 *nm*:

$$UI = \frac{\Delta E/min}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}8}{0{,}2} \cdot 10^6 = \Delta E/min \times 1212 \ \mu Moli/min/\text{litru}$$

b) la 340 *nm*:

$$UI = \Delta E/min \times 645 \ \mu Moli/min/\text{litru}$$

Observaţii. 1) Determinările prin testul optic sînt absolut specifice pentru determinarea activităţii transaminazice. *2*) Se obţin rezultate identice atît pe ser, cît şi pe plasmă. *3*) Dacă nu se face analiza în decurs de 4 ore de la recoltarea sîngelui, se va congela serul. *4*) Se poate lucra şi cu 20 μl ser, în acest caz prelungim durata de măsurare la 10—20 *min. 5*) Dacă se folosesc înregistratoare se pot determina cîteva sute de seruri zilnic.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie cliniqué, théorique et pratique,* Doin, Paris, 1967.

8.7. | Dozarea activităţii ornitin-carbamiltransferazei

Ornitin-carbamiltransferaza (OCT) este o enzimă hepatică care intervine în biosinteza ureei, reglînd echilibrul ornitină-citrulină, conform reacţiei:

$$\text{ornitină} + \text{carbamilfosfat} \rightleftharpoons \text{citrulină} + \text{fosfat}$$

Reacţia poate fi deplasată spre strînga, făcînd să acţioneze enzima asupra unui substrat de citrulină-arseniat la $pH = 7{,}15$. Radicalul carbamil obţinut se descompune în CO_2 şi NH_3. Amoniacul eliberat şi dozat pe baza unei reacţii de culoare constituie o măsură a activităţii enzimei.

8.7.1. | METODA CU MICRODIFUZIUNE ÎN CELULA CONWAY

Principiu. Conform reacţiei arătate mai sus sub acţiunea OCT se eliberează din citrulină amoniac care este apoi difuzat în celula Conway şi captat în mediu acid fiind dozat ulterior pe baza reacţiei de

Scanned with OKEN Scanner

culoare Berthelot (indofenol). Principiul acestei reacţii a fost descris la metoda de dozare a ureei cu urează (vezi pag. 140).

Reactivi. *1*) Amestec pentru etanşeizarea celulelor Conway: glicerol 9 volume, soluţie saturată carbonat de potasiu 1 volum, gumă arabică în cantitate necesară pentru a obţine o consistenţă care să asigure lipirea. Capacele celulelor Conway de sticlă sau plastic sînt obduse cu acest amestec. *2*) Tampon arseniat 0,5 *M*, *pH* 7,15. Se dizolvă 15,60 *g* arseniat de sodiu ($Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$) în 80 *ml* apă bidistilată, se ajustează *pH* la 7,15 cu HCl 1 *N* şi se aduce volumul la 100 *ml* cu apă bidistilată. *3*) Substrat citrulină-arseniat. Se dizolvă 350 *mg* d-l citrulină în 10 *ml* tampon arseniat 0,5 *M*. Se conservă la +4°C. *4*) Acid percloric 4 *N*: 37,5 *ml* $HClO_4$ (65%) apă bidistilată pînă la 100 *ml*. *5*) Soluţie saturată carbonat de potasiu. Se suspendă 125 *g* carbonat de potasiu în 100 *ml* apă bidistilată şi se fierbe timp de 10 minute. Se lasă să se răcească şi se filtrează. *6*) H_2SO_4 0,01 *N*. *7*) Soluţie standard de azot amoniacal. Se dizolvă 1,416 *g* sulfat de amoniu $(NH_4)_2\ SO_4$ pur şi uscat, în apă bidistilată şi se aduce volumul la 1000 *ml*. Această soluţie conţine 30 *mg* azot amoniacal/100 *ml* (300 µg/*ml*). În momentul utilizării se diluează 1/100, obţinîndu-se o soluţie de lucru ce conţine 3 µg azot amoniacal/1 *ml*. *8*) Soluţie fenolat de sodiu la *pH* 8. Se dizolvă 2,5 *g* fenol pur în 80 *ml* apă bidistilată se adaugă 2,5 *ml* NaOH 0,1 *N*. Se ajustează la *pH* 8 cu NaOH 0,1 *N* şi se aduce volumul la 100 *ml* cu apă bidistilată. *9*) Soluţie nitroprusiat de sodiu 0,5%. Se dizolvă 0,5 *g* nitroprusiat în 100 *ml* apă bidistilată. Se păstrează 10—14 zile la întuneric şi se diluează 1/100 în momentul utilizării. *10*) Reactiv hipoclorit. Se obţine prin diluarea a 1 *ml* soluţie hipoclorit comercial (apă Javel) la 100 *ml* NaOH 0,1 *N*. Se ajunge la o concentraţie finală de hipoclorit de 0,35 *g*%. Concentraţia în hipoclorit a soluţiei stoc se va titra iodometric (vezi pag. 141). Ca în orice dozare de amoniac se vor lua precauţii ca apa distilată să nu fie contaminată (bidistilare în prezenţă de cîteva picături de acid sulfuric).

Tehnica. Determinarea activităţii OCT implică *a*) o incubare pentru desfăşurarea reacţiei enzimatice, *b*) microdifuziunea amoniacului în celula Conway şi captarea acesteia în acid sulfuric 0,01 *N*, *c*) dozarea amoniacului prin reacţia de culoare.

a) *Incubarea.* Se amestecă 1 *ml* ser cu 1 *ml* substrat citrulină arseniat (reactiv 3). Se astupă cu dop eprubetele şi se incubează timp de 24 *h* la baia de apă, la 37°C. În paralel cu proba se incubează 3 probe martor dintre care una (martor cu ser) conţine 1 *ml* ser + 1 *ml* tampon arseniat (reactiv 2); a doua probă martor (martor cu citrulină) conţine 1 *ml* substrat citrulină arseniat + 1 *ml* apă bidistilată; al treilea martor (martor cu tampon) conţine 1 *ml* tampon + 1 *ml* apă bi-

Scanned with OKEN Scanner

distilată. Martorul cu ser fără citrulină se utilizează pentru eliminarea valorilor amoniacului din ser care nu e produs prin transformarea substratului, iar martorul cu citrulină are drept scop verificarea stabilităţii citrulinei.

După 24 de ore de incubare la 37°C se adaugă în toate eprubetele (probă şi cei trei martori) cîte 0,2 *ml* acid percloric 4 *N*. Se amestecă bine şi se centrifughează.

b) *Microdifuziune în celulele Conway.* Se introduc în partea centrală a celulei Conway 1,5 *ml* H_2SO_4 0,01 *N* iar în camera exterioară se pipetează pe rînd 1,1 *ml* supernatant obţinut după centrifugare (corespunzînd la 0,5 *ml* ser) şi 2 *ml* soluţie saturată de carbonat de potasiu. Pentru evitarea unei amestecări premature a supernatantului cu soluţia de carbonat de potasiu cele două componente se vor plasa în puncte diametral opuse ale camerei exterioare. Se astupă apoi celulele de difuziune cu căpăcele obduse cu amestec de etanşeizare (reactiv 1) şi se agită pe rotaţie orizontală lăsîndu-se la 37°C în termostat timp de 60 de min. pentru ca amoniacul eliberat în mediu alcalin din camera exterioară să difuzeze în partea centrală a celulelor unde este captat în H_2SO_4 0,01 *N*.

c) *Dezvoltarea reacţiei de culoare.* Se pipetează în cîte o eprubetă separată 1 *ml* din lichidul de difuziune din partea centrală a celulei Conway din probă şi respectiv din cele trei probe martor. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă 1 *ml* soluţie fenolat de sodiu, 1 *ml* nitroprusiat de sodiu (diluat 1/100) se amestecă şi se adaugă apoi 2 *ml* soluţie hipoclorit de sodiu. Se ţine pe baia de apă la 37°C timp de 45 *min.*, obţinîndu-se o coloraţie albastră. Se citesc extincţiile la 630 *nm* în cuva de 1 *cm* şi anume proba se citeşte faţă de martor cu ser iar martorul cu citrulină faţă de martorul cu tampon. Această ultimă citire are doar scopul de a verifica dacă citrulina nu este degradată.

Calcul. Extincţiile obţinute se interpolează la o curbă de calibrare alcătuită cu diluţii din soluţia etalon de azot amoniacal. Pentru respectarea unor condiţii cît mai identice cu cele din proba de analizat — se efectuează o difuziune cu cîte 1 *ml* soluţie etalon conţinînd respectiv 1,5; 3; 4,5 şi 6 µg azot amoniacal, şi se practică reacţia de culoare pe lichidul de difuziune. Ca probă în alb pentru probele etalon se utilizează lichidul provenit din difuziunea unui *ml* apă bidistilată.

Întrucît lichidul de difuziune al probei corespunde la 0,5 *ml* ser de analizat rezultatele se exprimă în micrograme (µg) azot amoniacal/0,5 *ml* ser.

Valori normale: 0—0,8 µg azot amoniacal/0,5 *ml* ser. Avîndu-se în vedere că un micromol azot amoniacal = 14 µg, aceste valori convertite în *mU/ml* ar fi de 0—0,1 *mU/ml*/minut.

Scanned with OKEN Scanner

Creşterea activităţii OCT în ser constituie un indicator deosebit de fidel al creşterii permeabilităţii membranei hepatocitului aşa cum survine în leziunile hepato-celulare din hepatite.

Observaţii. În locul reacţiei de culoare Berthelot se poate folosi reactivul Nessler, care în cazul de faţă se prepară în două etape în modul următor: se prepară în primul rînd tetraiodomercuriatul de potasiu, introducîndu-se într-un balon de 1 litru 36 *g* KI, apă bidistilată pentru dizolvare şi 13,55 *g* $HgCl_2$ fin pulverizat. După dizolvare se aduce la 1 litru cu apă bidistilată şi se păstrează în sticlă brună. Înainte de utilizare se amestecă 10 volume din soluţia de mai sus, de tetraiodomercuriat de potasiu, cu 3 volume NaOH 10 *N*. Reacţia de culoare se poate practica direct în camera centrală a celulei Conway, în care se adaugă, peste lichidul de difuziune, 4 picături reactiv Nessler şi 1,3 *ml* apă bidistilată.

Citirile se efectuează în acest caz la 400 *nm*, iar calcularea şi exprimarea rezultatelor se face aşa cum s-a arătat mai sus.

BIBLIOGRAFIE

Demange, G., Ballan, P., Moretti, G. P., Staeffen, J., Catanzano, G. et Lafaix, I. M., Presse Med., 70 (1962), 1032.

8.7.2. | METODA SIMPLIFICATĂ DE DOZARE A OCT

Principiu. Amoniacul eliberat sub acţiunea OCT din citrulină este dozat colorimetric, prin reacţia Berthelot, direct din amestecul de ser şi substrat.

Reactivi. Aceiaşi ca şi la metoda precedentă cu deosebirea standardului de azot amoniacal (reactiv 7). Acesta se prepară în modul următor: se dizolvă 464 *mg* sulfat de amoniu pur şi uscat în apă bidistilată se adaugă 2 *ml* H_2SO_4 concentrat şi se aduce volumul la 1000 *ml* cu apă bidistilată. Această soluţie stoc conţine 7 micromoli azot amoniacal/1 *ml*. Înainte de utilizare se amestecă 10 *ml* soluţie stoc cu 40 *ml* apă bidistilată obţinîndu-se o soluţie standard de lucru care conţine 1,4 micromoli azot amoniacal/1 *ml*.

Tehnica. Se incubează într-o eprubetă serologică (eprubeta a) 0,2 *ml* ser cu 0,2 *ml* substrat citrulină arseniat timp de 24 de ore la 37°C. În paralel se pipetează în două eprubete serologice diferite 0,2 *ml* ser (eprubeta b) şi 0,3 *ml* substrat citrulină arseniat (eprubeta c). Aceste două eprubete se vor incuba în paralel cu probe de analizat. În cursul incubării eprubetele vor fi astupate cu dopuri de cauciuc bine ajustate.

Scanned with OKEN Scanner

După incubare se scot 0,05 din probă şi se trec într-o altă eprubetă (eprubeta probă P).

Pentru prepararea martorului se scot 0,2 *ml* substrat din eprubeta c şi se amestecă cu cei 0,2 *ml* ser din eprubeta b. Din amestec se scot apoi 0,05 *ml* şi se trec în altă eprubetă (eprubeta martor M). Imediat se pipetează cîte 1 *ml* soluţie fenolat de sodiu (reactiv 8) în cele două eprubete P şi M. După 3 minute se adaugă cîte 1 *ml* soluţie nitroprusiat de sodiu (reactiv 9) şi apoi 2 *ml* soluţie hipoclorit (reactiv 10) şi se incubează 15 minute la 37°C pentru dezvoltarea reacţiei de culoare.

În paralel se pipetează în alte două eprubete 0,05 *ml* soluţie standard de lucru şi respectiv 0,05 *ml* apă bidistilată (probă în alb pentru standard), procedîndu-se în continuare ca şi în cazul eprubetelor P şi M.

Citirile extincţiilor se efectuează la 630 *nm* în cuve de 1 *cm*. Proba (P) se citeşte faţă de martor (M) iar standardul de azot amoniacal se citeşte faţă de eprubeta cu proba în alb pentru standard.

Calcul. Exprimarea rezultatelor se face în unităţi internaţionale (*U.I.*/litru sau *mU/ml*). O unitate reprezentînd activitatea enzimatică care transferă 1 micromol citrulină în ornitină (şi respectiv eliberează 1 micromol amoniac) în decurs de 1 minut la 37°C.

Pentru calcularea în *mU/ml* se ţine cont de concentraţia standardului, 1,4 micromoli/1 *ml*, şi de faptul că s-a luat în lucru 0,05 *ml* care conţin 0,07 micromoli. Se ia de asemenea în considerare că amoniacul dozat din probă corespunde la 0,025 *ml* ser (0,2 *ml* ser incubat cu 0,2 *ml* substrat din care se iau pentru dozare 0,05 *ml* amestec). Pentru exprimarea activităţii la unitatea de timp se va avea în vedere că incubarea s-a efectuat pe timp de 24 ore. În consecinţă:

$$\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 0{,}07 \times \frac{1000}{0{,}025} \times \frac{1}{24 \times 60\ min} = UI/\text{litru}$$

sau după simplificări:

$$\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 1{,}94 = U.I./\text{litru (respectiv } mU/ml)$$

Observaţii. Substratul de citrulină are tendinţă să elibereze în mod spontan amoniac. Din acest motiv efectuarea unui martor este absolut necesară. Dacă punctul de 0 nu se poate fixa cu martorul (proba M) citirile probei P şi a martorului M se vor face faţă de proba în alb făcîndu-se ulterior diferenţa extincţiilor:

$$mU/ml = \frac{E \text{ probei} - E \text{ martor}}{E \text{ standard}} \times 1{,}94$$

Scanned with OKEN Scanner

Această metodă este mai puţin sensibilă decît metoda cu microdifuziune. Datorită simplităţii, ea este însă deosebit de utilă în laboratorul clinic. Valorile normale sînt pînă la 0,9 *UI*/litru în timp ce în metoda precedentă se admit doar valori de 0—0,1 *UI*/litru (*mU/ml*). Din acest motiv, variaţiile mici de OCT nu sînt sesizate cu această metodă, dar creşterile patologice pot fi bine detectate.

BIBLIOGRAFIE

Konttinen, A., Clin. Chim. Acta, 21 (1968), 29. Morretti, G., Staeffen, I., Ballan, P., Ferren, I., Roques, I. C., Broustet, A., Beylot, J., Ann. Biol. Clin., 28 (1970), 79.

8.8. | Determinarea activităţii creatin-fosfokinazei

Creatin-fosfokinaza (creatinkinaza, CPK) este o enzimă localizată cu predominanţă în musculatora scheletică şi miocard şi care catalizează reacţia:

$$\text{creatină} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{creatin-fosfat} + \text{ADP}$$

Dozarea activităţii enzimei se poate efectua măsurînd un produs al reacţiei enzimatice respectiv creatina formată din creatin-fosfatul incubat cu sursa de enzimă în prezenţa de ADP. Întrucît această metodă implică dificultăţi tehnice, reproducem mai jos o metodă rapidă bazată pe testul optic în care activitatea CPK este cuplată cu activitatea altor enzime (piruvat kinază lacticodehidrogenază). Acest sistem permite măsurarea indirectă a activităţii CPK în funcţie de viteza de oxidare a $NADH+H^+$.

8.8.1. | DETERMINAREA ACTIVITĂŢII CPK PRIN TESTUL OPTIC

Principiu. Testul optic de determinare al activităţii CPK se bazează pe trei reacţii enzimatice:

1) Reacţia de analizat catalizată de CPK:

$$\text{creatină} + \text{ATP} \rightarrow \text{creatin fosfat} + \text{ADP}$$

2) Reacţia auxiliară catalizată de piruvat kinază:

$$\text{ADP} + \text{fosfoenolpiruvat} \rightarrow \text{Piruvat} + \text{ATP}$$

3) Reacţia indicatoare catalizată de lacticodehidrogenază:

$$\text{Piruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{lactat} + \text{NAD}$$

La un $pH = 9$ şi în prezenţa unor concentraţii optime de lacticodehidrogenază, piruvat kinază, ATP, fosfoenolpiruvat, creatină,

Scanned with OKEN Scanner

ioni de magneziu și NADH, oxidarea acestuia din urmă depinde de activitatea CPK în materialul de analizat.

Reactivi. *1*) Amestec tampon coenzimă (tampon glicină 2 *M*, *pH*= 9,0; NADH $1{,}3 \times 10^{-3}$ *M*; ATP 2×10^{-2} *M*; fosfoenolpiruvat 2×10^{-3}; $MgSO_4$ 2×10^{-2} *M*): 2,25 *g* glicină, 0,67 *g* Na_2CO_3 anhidru, 17 *mg* NADH-Na_2, 180 *mg* ATP-$Na_2H_2 \cdot 3H_2O$, 15 *mg* fosfoenolpiruvat (sare de ciclohexilamoniu), 40 *mg* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, apă bidistilată pînă la 15 *ml*.

2) Lacticodehidrogenază-piruvat kinază (LDH-PK) (2 *mg* din fiecare proteină/*ml*). Dacă este necesar suspensiile stoc de LDH și respectiv PK se diluează cu sulfat de amoniu 2,2 *M* la 4 *mg* proteină/*ml* și se amestecă cele două suspensii în părți egale.

3) Tampon creatină-glicină (creatină $6{,}3 \times 10^{-2}$ *M*, în tampon glicină 10^{-1} *M*, *pH* = 9,0): 350 *mg* creatină, 300 *mg* glicină, 90 *mg* Na_2CO_3 anh., apă distilată pînă la 40 *ml*.

4) Tampon glicină (10^{-1} *M*, *pH* = 9,0): 300 *mg* glicină, 90 *mg* Na_2CO_3 anh., apă distilată pînă la 40 *ml*.

Puritatea reactivilor. Preparatele de LDH și PK trebuie să fie libere de fosfatază, CPK și ATP-aze. Activitatea specifică a LDH trebuie să fie mai mică de 270 unități (după Racker, 1 unitate este cantitatea de enzimă care convertește 1 *μmol* de substrat în 1 minut), și cea a PK mai mică de 73 unități/*mg*. ATP-ul și fosfoenolpiruvatul (PEP) trebuie să fie pe cît posibil libere de ADP și respectiv piruvat.

Stabilitatea soluțiilor. Soluțiile se păstrează acoperite în frigider la 0—4°C. Amestecul tampon-coenzimă se prepară proaspăt, săptămînal, iar tamponul creatină-glicină și tamponul glicină se prepară proaspete, o dată pe lună. Alterarea soluțiilor se datorește de cele mai multe ori microorganismelor. Suspensiile enzimatice sînt stabile aproximativ un an.

Tehnica. Este preferabil să se utilizeze ser proaspăt. O ușoară hemoliză nu interferează, deoarece CPK nu a fost detectat în eritrocite.

Măsurătorile spectrofotometrice se fac la 340—366 *nm*, în cuvă de 1 *cm*, la un volum final de 3,50 *ml*, la temperatura de 25°C (trebuie să fie constantă, preferabil termostatat). Măsurătorile se fac față de proba martor (pentru a exclude NADH oxidaza și PEP hidrolizat de fosfatază, care este frecvent conținută în ser patologic).

reactivi	*cuva cu probă*	*cuva cu martor*
ser (*ml*)	1,00	1,00
amestec tampon coenzimă (*ml*)	0,70	0,70
LDH—PK suspensie (*ml*)	0,05	0,05

Scanned with OKEN Scanner

Se amestecă bine cu o baghetă de sticlă și se lasă să stea cca 5 minute. Piruvatul și ADP conținuți în PEP și respectiv ATP reacționează cu NADH. După care se introduce în cuve:

tampon creatină-glicină (*ml*)	1,75	—
tampon glicină (*ml*)	—	1,75

În cuva cu probă, reacția cu CPK începe abia acum. Se ajustează spectrofotometrul în așa fel încît atunci cînd cuva cu martor se găsește în dreptul fantei de lumină densitatea optică să fie 0,300. Se citește apoi densitatea optică a probei și se notează cu E_1. Se reajustează densitatea optică a martorului la 0,300 și după exact 10 minute se citește din nou densitatea optică a probei. Se notează cu E_2. În calcul este folosită diferența $E_1 - E_2 = \Delta E \cdot \Delta E$ măsurat la 366 *nm* nu trebuie să fie mai mare de 0,300/10 minute. În caz contrar, serul se diluează cu NaCl 0,9% și măsurătorile se repetă.

Cu ser normal activitatea CPK este atît de scăzută încît exactitatea măsurătorilor este limitată de stabilitatea instrumentelor de măsură. Obținerea de valori negative pentru ΔE nu poate fi exclusă.

Calcul. În testul optic unitatea Wroblewsky se definește ca fiind cantitatea de enzimă într-un *ml* probă, care schimbă densitatea optică a $NADH_2$-ului la 340 *nm*, cu 0,001 în 1 minut, într-un amestec de reacție de 3 *ml* la 25°C. Deci cu 1 *ml* probă in 3,5 *ml* amestec de reacție și cu o perioadă de incubație de 10 minute la 340 *nm*: (ΔE_{340}/10 min) × 116 = unități/*ml* probă.

La 366 *nm*: (ΔE_{366}/10 min) × 116 × 1,89 = (ΔE_{366}/10 min) × 220 = unități/*ml* probă.

Exemplu: 1 *ml* ser (în infarct miocardic) a prezentat următoarele densități optice la 366 *nm:*

$E_1 = 0{,}328 \quad \Delta E = E_1 - E_2 = 0{,}328 - 0{,}273 = 0{,}055$
$E_2 = 0{,}273$
$0{,}055 \times 220 = 12{,}1$ unități Wroblewsky/*ml* ser.

Calculul poate fi efectuat și în unități internaționale (*mU/ml*) conform formulei: $mU/ml = \frac{\Delta E/10 \text{ min}}{3000 \times 1 \times 10} \times \frac{3{,}5}{1} \times 10^6$ iar după simplificări $mU/ml = \Delta E/\text{min} \times 106$. Pentru explicații vezi partea generală (pag. 320).

Pentru transformarea unităților Wroblewsky în unități internaționale (*mU/ml*) se folosește factorul de conversiune 0,48; 1 unitate Wroblewsky = 0,48 *mU/ml*.

Valori normale și interpretare. În serul normal, valorile CPK nu sînt detectabile, dar activitatea poate crește după un efort muscular chiar și la normali. Valori sub 1,5 unități Wroblewsky (sau sub 0,7 *mU/ml*) sînt considerate normale. În afecțiunile musculatorii (mio-

Scanned with OKEN Scanner

patii, miozite) și în infarctul miocardic se constată creșteri marcate și precoce ale CPK.

Observații. Fosfataza alcalină (produce piruvat din PEP), ATP-aza și miokinaza (produce ADP din ATP), NADH oxidaza (oxidează NADH-ul) pot interfera cu determinarea CPK. Interferențele pot fi însă eliminate prin proba martor.

Metoda poate fi modificată utilizîndu-se cantități mai mici de ser (0,2 *ml*) și un volum al amestecului de reacție corespunzător mai scăzut. Întrucît enzima se inactivează destul de rapid prin oxidarea grupărilor SH, putînd duce la rezultate fals-negative, s-a încercat o reactivare a CPK prin adausul de cisteină sau glutation redus. Forster propune în consecință următoarea variantă de determinare a CPK.

Se realizează în cuva spectrofotometrului un amestec din 0,2 *ml* ser + 0,5 *ml* din soluția conținînd NADH 0,001 *M*, ATP 0,006 *M*, fosfoenolpiruvat 0,002 *M*, în tampon glicină 0,1 *M* pH=9 + 0,05 *ml* LDH 2 *mg/ml*, piruvat kinază 2 *mg/ml* în $MgCl_2$ 0,05 *M* + 0,25 *ml* cisteină sau glutation 0,024 *M* în apă distilată (reactiv proaspăt preparat). Se incubează în cuvă și se adaugă apoi 1 *ml* substrat creatină 0,063 *M* în tampon glicină 0,1 *M*. Martorul conține aceiași reactivi cu deosebire că în locul substratului de creatină, se adaugă 1 *ml* tampon glicină. Se notează ΔE pe timp de 10 minute.

Pentru calcul se utilizează formula:

$$mU/ml = \Delta E/10 \text{ minute} \times 303$$

Cu această metodă de reactivare a enzimei prin grupări SH valorile normale ale CPK sînt de pînă la 8 *mU/ml*, iar valorile patologice sînt mai frecvent depistate.

Dată fiind complexitatea reactivilor folosiți aceștia sînt de regulă furnizați de diverse firme (ex. Boehringer Mannheim) sub forma unor amestecuri adecvate care urmează a fi dizolvate în tampon înainte de utilizare.

BIBLIOGRAFIE

Bernt, E., Bergmeyer, H. U., *Creatine Phosphokinase* în *Methods of Enzymatic Analysis* ed. by H. U. Bergmayer, Verlag Chemie GMBH, Weinheim/Bergstr.-Acad. Press, New York—London, 1965, p. 859—962. Forster, G., Diskussion in H. Aebi, H. Mattenheimer, F. W. Schmidt. Praktische Enzymologie Ed. Hans Huber, Berna—Stuttgart, 1968, p. 238.

Scanned with OKEN Scanner

8.9. | Determinarea activităţii lactat-dehidrogenazei (LDH)

Lactico-dehidrogenaza (LDH) catalizează reacţia de transformare reversibilă a piruvatului în lactat, fiind o enzimă prezentă în majoritatea organelor şi ţesuturilor. S-au putut evidenţia însă forme moleculare diferite (izoenzime) ale LDH, unele de proveniență miocardică, altele de proveniență musculară sau hepatică. Pentru clinică are importanţă atît determinarea activităţii globale cît mai ales cercetarea comportării izoenzimelor.

8.9.1. | DETERMINAREA ACTIVITĂŢII GLOBALE A LACTAT-DEHIDROGENAZEI (TESTUL OPTIC)

Principiu. Se utilizează reacţia (catalizată de lactat-dehidrogenază). piruvat + $NADH_2 \rightleftharpoons$ lactat + NAD.

Dacă determinarea se face la *pH* 7,5 se măsoară reacţia de transformare a piruvatului în lactat. La *pH* 9 predomină transformarea lactatului în piruvat.

Condiţii de determinare. Concentraţii finale: $NADH_2$ 0,428 *mM*, piruvat 0,860 *mM*, tampon trietanolamină 50 *mM*, EDTA 5 *mM*, *pH* 7,5, 25°C, lungime de undă 340 sau 366 *nm*, d = 1 *cm*.

Soluţii pentru analiză. Soluţie I: se dizolvă 8 *mg* $NADH_2$ în 20 *ml* tampon trietanolamină EDTA, se prepară proaspătă în fiecare zi.

Soluţie II: 4 părţi tampon trietanolamină EDTA 50 *mM* şi 1 parte sol. piruvat 30 *mM*.

Tehnica. Se incubează în cuva spectrofotometrului timp de 5 minute 0,5 *ml* sol. I cu 0,1 *ml* ser, se controlează extincţia timp de 1 minut, apoi se declanşează reacţia enzimatică, adăugînd 0,1 *ml* sol. II. Se măsoară variaţia de extincţie 0,5—2 *min* şi se calculează scăderea extincţiei pe timp de 1 minut ($\Delta E/min$). Cunoscîndu-se coeficientul de extincţie al NADH, volumul serului analizat (0,1 *ml*) şi volumul amestecului (0,7 *ml*) se poate calcula activitatea în unităţi internaţionale (*mU/ml*).

Calcul. a) la 366 *nm*:

$$UI = \frac{\Delta E/\text{min}}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}7}{0{,}1} \cdot 10^6 = \Delta E/min \cdot 2120 \ \mu Moli/min/\text{litru} \ (25°C)$$

b) la 340 *nm*:

$$UI = \Delta E/min \cdot 1125 \ \mu Moli/min/\text{litru} \ (25°C).$$

Valori normale: 120—240 *UI*/litru (sau *mU/ml*).

Observaţii. 1) Dacă activitatea serului este prea mare se poate ca tot $NADH_2$ să fie consumat în primele minute şi nu se observă nici

Scanned with OKEN Scanner

o activitate. La extincţii peste 0,1/*min* la 340 *nm* sau 0,05/*min* la 366 *nm* se repetă determinarea cu ser diluat 1/10 cu NaCl 0,9%.

2) Există variante ale testului optic care utilizează concentraţii diferite ale substratelor şi tampon de fosfat 50 *mM*. Tendinţa actuală este de a se furniza laboratoarelor amestecuri potrivite de reactivi sub formă standardizată cum ar fi Biochemica-Test Combinationen oferite de firma Boehringer Mannheim. La Catedra de biochimie din Cluj, conf. dr. O. Bîrzu a pregătit astfel de teste optice pentru uzul laboratoarelor clinice.

3) Activitatea globală a LDH poate fi determinată şi colorimetric, măsurîndu-se, prin reacţia de culoare cu 2—4 dinitrofenilhidrazină (la 525 *nm*), scăderea concentraţiei piruvatului din substratul supus acţiunii enzimei în prezenţa de NADH (Cabaud şi Wroblewsky). O altă metodă se bazează pe reacţia de culoare produsă prin reducerea albastrului de tetrazoliu în cursul transformării lactatului în piruvat sub acţiunea LDH în prezenţa de NAD şi metosulfat de fenazină (Babson şi Phillips).

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique, théoriques et pratique,* Doin, Paris, 1967. Babson, A. L., Phillips, G. E., Clin. Chim. Acta, 12, (1965), 210. 55. Cabaud, P. G., Wroblewsky, F., Am. J. Clin. Path., 30 (1958), 234.

8.9.2. | DETERMINAREA ACTIVITĂŢII IZOENZIMELOR LDH

Lactat dehidrogenaza poate fi separată prin diverse metode în 5 forme moleculare diferite ca proprietăţi fizico-chimice care catalizează însă aceeaşi reacţie enzimatică. Aceste 5 izoenzime sînt formate din combinaţii sub formă de tetrameri a două subunităţi: subunitatea H (de origine miocardică) şi subunitatea M (de origine musculară sau hepatică). Cele 5 izoenzime LDH au următoarea alcătuire: LHD_1 (4 H), LDH_2 (3 H + 1 M), LDH_3 (2 H + 2 M), LDH_4 (1 H + 3 M) şi LDH_5 (4 M). Prin urmare forme pure sînt doar (LDH_1 (4 H) şi LDH_5 (4 M).

LDH_1 prezintă migrarea electroforetică anodică cea mai rapidă iar LDH_5 este cea mai lentă. De asemenea LDH_1 se absoarbe în mod selectiv pe DEAE celuloză sau DEAE Sephadex şi totodată prezintă activitate enzimatică nu numai asupra piruvatului dar şi asupra alfa-ceto-butiratului.

În laboratoarele clinice diferenţierea izoenzimelor LDH poate fi efectuată 1) prin determinarea activităţii LDH după adsorbţia pe DEAE Sephadex; 2) prin metode electroforetice şi 3) prin determinarea activităţii alfa-cetobutirat dehidrogenazei.

Scanned with OKEN Scanner

8.9.2.1. DIFERENȚIEREA IZOENZIMELOR LDH PRIN ADSORBȚIE PE DEAE SEPHADEX

Principiu. Prin amestecarea serului de analizat cu o suspensie de DEAE Sephadex se produce adsorbția izoenzimei LDH_1, iar după centrifugare se determină activitatea LDH în supernatant. Diferența între activitatea LDH în serul neadsorbit și în serul adsorbit reprezintă activitatea izoenzimei LDH_1.

Reactivi. 1) Suspensie DEAE-Sephadex A 50 (50 *mg/ml*). Înainte de utilizare se agită bine. Se păstrează timp de un an la +4°C. *2)* Toți reactivii necesari pentru determinarea activității LDH (vezi mai sus 8.9.1.).

Tehnica. Într-o eprubetă de centrifugă se amestecă 1 *ml* ser și 1 *ml* suspensie DEAE Sephadex. Se lasă să stea timp de 10 minute la temperatura cemerei (25°C) și se centrifughează. Se iau apoi 0,1 *ml* din supernatant și se determină activitatea LDH (așa cum s-a arătat mai sus). Se efectuează o determinare a activității LDH și din 0,1 *ml* ser neadsorbit.

Calcul. Se va ține cont că în cursul amestecării cu suspensie de DEAE Sephadex s-a produs o diluare a serului adsorbit (factor de diluție 1,5).

Activitatea LDH adsorbită (de tip miocardic) = activitatea LDH globală − 1,5 × activitatea LDH neadsorbită

Observații. O metodă și mai simplă de diferențiere se bazează pe proprietatea izoenzimelor LDH_4 și LDH_5 (tip muscular, hepatic) de a fi inactivate la temperatura de 60°C, în timp ce izoenzimele LDH_1 și LDH_2 (tip miocardic) rezistă. În consecință se determină activitatea LDH în serul neîncălzit și în serul încălzit timp de 60 minute la 60°C.

La normali activitatea LDH adsorbită (respectiv termostabilă) este de 50—70% din activitatea globală. Valori de peste 80% din activitatea LDH globală sugerează un infarct miocardic.

8.9.2.2. SEPARAREA ELECTROFORETICĂ A IZOENZIMELOR LDH

Principiu. După separarea izoenzimelor prin electroforeză pe acetat de celuloză, diferitele fracțiuni sînt puse în evidență prin reacția cu albastru de tetrazolium. În acest scop benzile de acetat de celuloză, conținînd izoenzimele, sînt incubate cu un amestec de lactat, NAD, albastru tetrazolium (NBT, nitro blue tetrazolium) și *metosulfat de fenazină.* Izoenzimele transformă lactatul în piruvat în paralel cu transformarea NAD în NADH+H. *Metosulfatul de fenazină* (metosulfatul de N-metilfenaziniu) transferă atomii de hidrogen de la NADH pe albastru de tetrazolium, care se reduce în acest fel spre un compus

Scanned with OKEN Scanner

colorat violet și insolubil, denumit formazan violet. Diferitele fracțiuni de izoenzime apar ca niște benzi violete pe mediul de suport și pot fi determinate cantitativ prin densitometrie.

Reactivi. *1*) Benzi de acetat de celuloză (cellogel 2,5 × 17 *cm*). *2*) Tampon fosfat 0,25 *M* *pH* = 7,4 (KH_2PO_4 anhidru 34 *g*, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 89,5 g, apă distilată pînă la 1000 *ml*). *3*) Soluție metosulfat de fenazină. Se dizolvă 10 *mg* metosulfat de fenazină în 10 *ml* apă distilată; stabilă timp de cel mult 30 zile la +4°C în sticlă brună. *4*) Reactiv lactat-albastru tetrazoliu. Se amestecă: 1,2 *ml* lactat de sodiu 60% cu 1,87 *g* $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0,27 *g* KH_2PO_4 anhidru, 50 *mg* NaCN, 25 *mg* albastru tetrazolium și 90 *ml* apă distilată. Reactivul extrem de toxic este stabil timp de 30 de zile la temperatura camerei. *5*) Amestec revelator: 8 *mg* NAD, 7,2 *ml* reactiv lactat-albastru tetrazolium (reactiv 4), 0,2 *ml* soluție metosulfat de fenazină. Se prepară înainte de utilizare și se păstrează la întuneric, timp de cel mult cîteva ore. *6*) Formol 10%. *7*) Reactiv pentru transparentizarea benzilor de cellogel: 30 *ml* formol 40%, 30 *ml* metanol, 30 *ml* apă distilată, 10 *ml* diaceton alcool (4-hidroxi-4-metilpentan-2-onă) 5 *ml* acid acetic glacial.

Tehnica. Se imersează benzile de acetat de celuloză (cellogel) timp de 10 minute în tampon fosfat. Se îndepărtează excesul de tampon între două hîrtii de filtru și se dispun benzile în aparatul de electroforeză ale cărui cuve au fost umplute în prealabil cu tampon. Se așază la mijlocul benzii 20 μ*l* ser nehemolizat (sau plasmă heparinată). Se efectuează migrarea electroforetică timp de 90 minute de la 170 *V* (3 *mA* pe bandă) notîndu-se cei doi poli. Se scot benzile din aparat și se acoperă cu amestec revelator (reactiv 5) într-o placă Petri care se ține timp de 15 minute la 37°C și la întuneric. Se fixează apoi benzile oprindu-se reacția enzimatică prin imersarea benzilor, în formol 10%, timp de 10 minute. Se efectuează apoi transparentizarea benzilor și se determină densimetric procentul diferitelor fracțiuni.

Interpretarea rezultatelor. În serurile normale apar evidente doar fracțiunile LDH_1 și mai ales LDH_2 în timp ce la nivelul celorlalte fracțiuni coloratia este foarte palidă. Procentajul normal al fracțiunilor (LDH_1—LDH_5) oscilează între 33—47—16—6—0 și 25—33—21—12—8.

În infarctele miocardice, seruri hemolizate și anemie de tip Biermer predomină izoenzimele LDH_1 și LDH_2. În leziunile hepatice se constată creșterea LDH_5.

Observații. Separarea electroforetică a izoenzimelor poate fi efectuată și în gel de amidon, poliacrilamidă, agar sau agaroză. Tehnica separării electroforetice variază în funcție de aparatură și de suportul pe care se efectuează electroforeza.

Scanned with OKEN Scanner

Este recomandabil ca la fiecare serie de examinări să se separe în paralel cu probele de analizat şi două probe de control şi anume un ser normal (pe care se vor evidenţia de regulă doar LDH_1 şi LDH_2) şi o plasmă provenită de la un nou-născut (sau ser din sîngele recoltat din cordonul ombilical). Plasma nou-născutului conţine mari cantităţi de LDH, iar toate cele cinci izoenzime sînt clar vizibile. În acest fel se poate obţine un control asupra calităţii separării şi totodată e posibilă o orientare rapidă asupra eventualelor modificări patologice chiar şi fără densitometrie. Amestecul revelator poate fi preparat şi fără NaCN. În acest scop se prepară înainte de incubare următorul amestec: 1 *ml* soluţie lactat de sodiu 60%, 3 *ml* soluţie albastru tetrazolium (1 *mg/ml*), 0,3 *ml* soluţie metosulfat de fenazină (1 *mg/ml*), 1 *ml* tampon fosfat 0,1 *M* $pH = 7{,}5$ şi 10 *mg* NAD.

BIBLIOGRAFIE

Guy Devaux, *Choix de Techniques de Biochimie Clinique*, Ed. Gauthier-Villars, Paris, 1970. Preston, I. A., Briere, R. O., Batsakis, I. G., Am. J. Clin. Path., 42 (1965), 256.

8.9.2.3. DETERMINAREA IZOENZIMEI LDH PE BAZA ACTIVITĂŢII ALFA-HIDROXIBUTIRAT-DEHIDROGENAZEI (HBDH)

Principiu. Se măsoară reacţia catalizată de enzimă: alfa-cetobutirat + NADH + H^+ ⇌ alfa-hidroxibutirat + NAD^+.

Condiţii de determinare. Concentraţii finale: alfa-cetobutirat 2,9 *mM*, $NADH_2$ 0,107 *mM*, tampon trietanolamină 50 *mM*, $pH = 7{,}5$, EDTA 5 *mM*, 25°C, lungime de undă 340 sau 366 *nm*, d = 1 *cm*, durata de măsurare 0,5—2 minute.

Soluţii pentru analiză. Soluţia I: se dizolvă 2 *mg* $NADH_2$ în 20 *ml* tampon trietanolamină EDTA. Se prepară proaspătă zilnic.

Soluţia II: 4 părţi tampon trietanolamină EDTA, 50 *mM*, 1 parte soluţie alfa-cetobutirat 100 *mM*.

Tehnica. Se incubează, timp de 5 *min*, 0,5 *ml* soluţie I cu 0,1 *ml* ser, se controlează extincţia timp de 1 min, apoi se declanşează reacţia enzimatică adăugînd 0,1 *ml* soluţie II. Se măsoară variaţia extincţiei timp de 0,5—2 *min*.

Calcul. a) la 366 *nm*:

$$UI = \frac{\Delta E/min}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}7}{0{,}1} \cdot 10^6 \ \mu Moli/min/\text{litru} = \Delta E/min \cdot 2120 \ (25\,°C)$$

Scanned with OKEN Scanner

b) la 340 *nm*:

$$\Delta E/min/1125\ \mu Moli/min/\text{litru}\ (25°C)$$

Valori normale: pînă la 140 *mU/ml* (*UI*/litru).

Interpretare. HBDH nu este o enzimă sui generis. Metoda dată este un procedeu simplu de determinare a izoenzimelor LDH cu migrare electroforetică rapidă, caracteristice pentru miocard, spre deosebire de izoenzima cu migrare lentă, localizată în ficat şi muşchi scheletic.

Observaţii. 1) Se poate lucra cu 20 *µl* ser, prelungind durata de măsurare la 5—10 minute. Serul şi plasma dau rezultate identice, dar pentru recoltare se va evita heparina şi oxalatul, care pot produce inhibiţie.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique, théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.

8.10. | Determinarea activităţii sorbitol-dehidrogenazei (SDH)

Principiu. Se măsoară reacţia catalizată de enzimă:

$$\text{D-fructoză} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{D-sorbitol} + NAD^+$$

Condiţii de determinare. Concentraţii finale: $NADH_2$ 95 *µM*, fructoză 278 *mM*, trietanolamină 50 *mM*, *pH* = 7,5, 25°C, lungime de undă 340 sau 366 *nm*, d = 1 *cm*, durata măsurării 2—4 *min*.

Soluţii pentru analiză. Soluţie I: 19 părţi soluţie tampon trietanolamină 50 *mM*, 1 parte soluţie $NADH_2$ 3 *mM*.

Soluţia II: fructoză 2,22 *M*.

Tehnica. Se incubează timp de 5 minute 0,5 *ml* soluţie I, cu 0,2 *ml* ser, se controlează extincţia timp de 1 *min*, apoi se declanşează reacţia enzimatică, adăugînd 0,1 *ml* soluţie II. Se măsoară variaţia extincţiei timp de 2—4 *min*.

Calcul. a) la 366 *nm*:

$$UI = \frac{\Delta E/min}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}8}{0{,}2} \cdot 10^6 = \Delta E/min \cdot 1212\ \mu Moli/min/\text{litru}\ (25°C)$$

b) la 340 *nm*:

$$UI = \Delta E/min \cdot 645\ \mu Moli/min/\text{litru}\ (25°C)$$

Scanned with OKEN Scanner

Pentru explicaţia calculelor vezi partea generală (pag. 89).

Valori normale: sub 0,8 *UI*/litru (*mU/ml*). Activitatea serică a sorbitol-dehidrogenazei creşte în leziuni ale celulelor hepatice.

Observaţii. 1) Determinarea este specifică. *2*) Eritrocitele fiind sărace în sorbitol-dehidrogenază, o hemoliză uşoară nu influenţează rezultatele.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique, théorique et pratique,* Doin, Paris, 1967.

8.11. | Determinarea activităţii glutamat-dehidrogenazei (GDH)

Principiu. Se măsoară oxidarea $NADH_2$ în prezenţa alfa-cetoglutaratului şi a amoniacului:

$$\text{alfa-cetoglutarat} + NH_4^+ + NADH + H^+ \rightarrow \text{L-glutamat} + NAD^+ + H_2O.$$

Condiţii de determinare. Concentraţii finale: alfa-cetoglutarat 5 *mM*, NH_4^+ 25 *mM*, $NADH_2$ 0,19 *mM*, trietanolamină 50 *mM*, EDTA 5 *mM*, *pH* = 7,5, 25°C, lungime de undă 340 sau 366 *nm*, d = 1 *cm*, durata de măsurare 2—5 *min*.

Soluţii pentru analiză. Soluţia I: 2 părţi soluţie $NADH_2$ 3 *mM*, 2 părţi soluţie acetat de amoniu 400 *mM*, 16 părţi tampon trietanolamină EDTA 50 *mM*.

Soluţia II: soluţie alfa-cetoglutarat 200 *mM*, 1 parte, şi 4 părţi tampon trietanolamină-EDTA 50 *mM*.

Tehnica. Se incubează 0,5 *ml* soluţie I cu 0,2 *ml* ser, timp de 5 *min*, se controlează extincţia timp de 1 *min*, apoi se declanşează reacţia adăugînd 0,1 *ml* soluţie II. Se urmăreşte variaţia extincţiei 1—3 *min*.

Calcul. a) La 366 *nm*:

$$UI = \frac{\Delta E/min}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}8}{0{,}2} \cdot 10^6 = \Delta E/min \cdot 1212 \ \mu Moli/min/\text{litru} \ (25°C)$$

b) La 340 *nm*:

$$UI = \Delta E/min \cdot 645 \ \mu Moli/min/\text{litru} \ (37°C)$$

Pentru explicaţii vezi partea generală (pag. 89).

Valori normale. Sub 1,5 *UI* (*mU/ml*).

Glutamat-dehidrogenaza este o enzimă mitocondrială iar creşterea ei în ser denotă o leziune avansată a celulelor hepatice (necroze celulare).

Observaţie. O hemoliză slabă nu influenţează rezultatele.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie clinique, théorique et pratique,* Doin, Paris, 1967.

8.12. | Determinarea 5-Nucleotidazei (5-N)

Principiu. Sub acţiunea 5-nucleotidazei din ser se eliberează fosfat anorganic din adenozin-5 fosfatul utilizat ca substrat. Această reacţie este catalizată şi de fosfataza alcalină nespecifică, astfel încît fosfatul anorganic eliberat din substrat reprezintă o măsură a activităţii combinate a ambelor enzime. Dacă reacţia este însă efectuată în prezenţa ionilor de nichel, 5-nucleotidaza este inhibată, iar fosfatul eliberat este produs doar sub acţiunea fosfatazelor nespecifice. Diferenţa între fosfatul eliberat din 5-adenozinfosfat în absenţa şi în prezenţa ionilor de nichel reprezintă activitatea 5-nucleotidazei.

Reactivi. 1) Acid tricloracetic 10%. *2*) Soluţie sulfat de mangan pentru activarea enzimei. Se dizolvă 0,32 *g* sulfat de mangan $MnSO_4 \cdot H_2O$ în 100 *ml* apă distilată. *3*) Soluţie clorură de nichel pentru inhibarea 5-nucleotidazei. Se dizolvă 2,4 *g* $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ în 100 *ml* apă distilată. *4*) Substrat de adenozin-5-fosfat: se dizolvă 347 *mg* adenozin-5-fosfat în 18 *ml* NaOH 0,1 *N* şi se aduce la 100 *ml* cu apă distilată. Se păstrează la +4°C. *5*) Tampon barbituric *pH* = 7,8. Se dizolvă 8,25 *g* dietilbarbiturat de sodiu în 140 *ml* HCl 0,2 *N* şi se aduce volumul la 1 litru cu apă distilată; *6*) Standard de fosfat şi reactivi pentru dozarea fosfaţilor (vezi metoda Briggs, pag. 250).

Tehnica. Se pregătesc două eprubete notate cu P (probă) şi M (martor). În probă se pipetează 1,5 *ml* tampon (reactiv 5), 0,1 *ml* sulfat de mangan şi 0,2 *ml* ser. În eprubeta martor se amestecă 1,3 *ml* tampon, 0,1 *ml* sulfat de mangan, 0,2 *ml* soluţie clorură de nichel şi 0,2 *ml* ser. Se aşază ambele eprubete pe baia de apă la 37°C şi după 5 minute se adaugă în fiecare eprubetă 0,2 *ml* substrat adenozin-5-fosfat. Se amestecă şi se incubează la 37°C exact 30 minute. După acest interval de timp se adaugă 2 *ml* acid tricloracetic 10% pentru oprirea reacţiei enzimatice şi se agită bine. Se filtrează sau se centrifughează.

Se iau apoi cîte 2 *ml* de filtrat din probă şi din martor şi se trec în alte eprubete care se notează cu P şi M.

Scanned with OKEN Scanner

În paralel se pregătesc în alte două eprubete un standard și o probă în alb. Pentru standard se pipetează 1 *ml* soluție standard (10 μg P/*ml*) și 1 *ml* acid tricloracetic 10% iar pentru proba în alb se iau 1 *ml* apă distilată și 1 *ml* acid tricloracetic 10%. Se adaugă apoi în standard, blanc, probă și martor reactivii necesari pentru dozarea fosforului (vezi pag. 250).

După dezvoltarea reacției de culoare se citesc extincțiile față de proba în alb.

Calcul. Rezultatele se exprimă în unități internaționale adică micromoli de fosfat exprimat ca fosfor, eliberați pe minut de un litru de ser la 37°C, și la $pH=7{,}8$. La calcul se ține cont că incubarea s-a făcut timp de 30 *min*, că în standard sînt 10 μg P și că în probă și martor se dozează fosforul din filtratul corespunzînd la 0,1 *ml* ser. Reamintim că un micromol de fosfat corespunde la 31 μg fosfor.

$$U.I./\text{litru} = \frac{E\ \text{probei} - E\ \text{martor}}{E\ \text{standard}} \times \frac{10}{31} \times \frac{1000}{0{,}1} \times \frac{1}{30}$$

$$\text{U.}I./\text{litru}\ (mU/ml) = \frac{E\ \text{probei} - E\ \text{martor}}{E\ \text{standard}} \times 107{,}6$$

Valori normale: 1,6—17 *mU/ml.* Activitatea 5-Nucleotidazei (5-N) crește mult în icterele mecanice alături de fosfataza alcalină, dar spre deosebire de aceasta din urmă 5-N nu se modifică în bolile osoase.

Observații. În locul ionilor activatori de mangan (reactiv 2) se pot folosi ionii de magneziu.

BIBLIOGRAFIE

Wooton, I. D. P., *Microanalysis in Medical Biochemistry,* Ed. J&A Churchill, London, 1964.

8.13. Determinarea ceruloplasminei (Metoda Ravin)

Principiul metodei se bazează pe faptul că această alfa$_2$globulină, conținînd cupru, prezintă „in vitro" proprietăți de fenoloxidază, catalizînd oxidarea parafenilendiaminei cu producerea unui compus colorat în violet.

Reactiv. 1) Tampon acetat de sodiu 0,4 *M*, $pH = 5{,}5$ Se dizolvă 54,4 *g* acetat de sodiu cristalizat ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) în 100 *ml* H_2O. Se iau 840 *ml* și se amestecă cu 160 *ml* acid acetic 24%

Scanned with OKEN Scanner

(V/V). Se ajustează *pH*-ul. Soluţia se păstrează la +4°C. 2) Soluţie azidă de sodiu 0,5%. Se păstrează nedefinit la temperatura camerei. Se utilizează pentru inhibarea activităţii enzimatice a ceruloplasminei. 3) Substrat parafenilendiamină diclorhidrat 0,5%. (În caz că substanţa nu este pură şi dă o soluţie slab colorată, ea se poate purifica şi decolora prin următorul procedeu: p. fenilendiamină se dizolvă într-un volum minim de apă distilată fierbinte, se decolorează cu cărbune, se filtrează soluţia fierbinte şi se recristalizează din filtrat. Cristalele albe sînt uscate şi păstrate în atmosferă rarefiată pe $CaCl_2$ în exicator).

Procedeu. 0,1 *ml* ser se amestecă cu 1 *ml* substrat (reactiv 3) şi 8 *ml* tampon acetat. Se incubează o oră la 37°C după care reacţia este inhibată prin adaosul a 1 *ml* de azidă de sodiu 0,5% (reactiv 2). Se plasează în frigider la +4°C pe timp de 30 minute. Se citeşte densitatea optică la 530 *nm* în cuvă de 1 *cm* faţă de un martor preparat şi incubat în paralel cu proba. Martorul conţine 0,1 *ml* ser, 8 *ml* tampon, 1 *ml* substrat şi 1 *ml* azidă de sodiu adăugată încă de la început pentru a opri reacţia enzimatică.

Extincţia probei citită faţă de martor înmulţită cu factorul 87,5 dă rezultatul în *mg* ceruloplasmină/100 *ml* ser.

$$E \times 87{,}5 = mg/100\ ml$$

Valorile normale ale ceruloplasminei sînt de $32{,}3 \pm 4{,}9$ *mg*/100 *ml*.

Interpretarea rezultatelor. Ceruloplasmina este produsă la nivelul ficatului, eliminîndu-se pe cale biliară. Din acest motiv un deficit în procesul de sinteză al ceruloplasminei poate fi mascat de o retenţie biliară, iar valoarea acestui test în bolile hepatice este limitată.

Valori mult scăzute (adeseori sub 10 *mg*/100 *ml*) sînt însă patognomonice pentru boala lui Wilson.

Creşteri ale ceruloplasminei se întîlnesc în icterele mecanice, în graviditate şi în reacţia de fază acută (inflamaţii, postoperator).

BIBLIOGRAFIE

Ravin, H. A., J. Lab. Clin. Med., 1961, 58, 161.

8.14. Determinarea activităţii lipolitice postheparinice (După Cucuianu şi colab.)

Principiu. Metoda se bazează pe faptul că injectarea intravenoasă a heparinei produce o eliberare de lipoproteinlipază de la nivelul endoteliilor vasculare şi totodată o activare a enzimei eliberate în circulaţie. Plasma recoltată la un anumit interval de timp de la injectarea heparinei şi deci conţinînd enzima activă se incubează cu o emulsie de

Scanned with OKEN Scanner

trigliceride, iar acizii graşi eliberaţi prin hidroliză sînt extraşi şi dozaţi fotocolorimetric.

Reactivi. *1*) Heparină 5000 *u/ml*. *2*) Heparină diluată cu apă distilată de 10 ori (500 *u/ml*). Se prepară proaspăt înainte de utilizare. *3*) Soluţie albumină bovină 25% în apă distilată. Se prepară în cantităţi mici de 2—4 *ml*, după necesităţi şi se păstrează la +4°C timp de 3—7 zile pînă în momentul utilizării. *4*) Soluţie NaOH 0,1 *N*. *5*) Tampon TRIS 0,1 *M*, *pH* = 8,8 (Se dizolvă 2,42 *g* TRIS în 100 *ml* apă distilată, se ajustează *pH*-ul la 8,8 cu HCl 0,2 *N* şi se aduce volumul la 200 *ml*). Se păstrează la +4°C. *6*) Substrat trigliceride. Se foloseşte preparatul Intralipid (Vitrum A. B. Stockholm) conţinînd 20 *g* trigliceride/100 *ml*. Se păstrează la +4°C. *7*) Substrat ajustat pentru incubare. Se amestecă 1 *ml* tampon TRIS (reactiv 5) cu 0,8 *ml* albumină bovină (reactiv 3), 0,8 *ml* NaOH 0,1 *N* şi 0,4 *ml* Intralipid. *8*) Amestec de extracţie Dole (vezi pag. 186). *9*) Reactivi pentru dozarea fotocolorimetrică a AGL (vezi pag. 187).

Procedeu. Activarea enzimei „in vivo". Întrucît stress-ul şi flămînzirea împiedică activarea lipoproteinlipazei, înainte de efectuarea probei subiectul va păstra repaus în poziţia declivă, şi va ingera 100 *g* glucoză în 250 *ml* apă. Totodată va evita fumatul. După 30 minute de la ingestia glucozei i se injectează intravenos 15 *u* heparină/*kg*, iar după alte 14 minute se recoltează 10 *ml* sînge care se trec într-o eprubetă siliconată, conţinînd 0,2 *ml* heparină diluată (10 *u/ml* sînge) şi răcită într-o baie de gheaţă. Sîngele răcit este centrifugat la 3500 turaţii timp de 15 minute. Plasma obţinută se foloseşte imediat (în caz că utilizarea nu e posibilă plasma se îngheaţă la —20°C şi se păstrează sub această formă).

Incubarea: 0,5 *ml* plasmă de analizat (plasmă post-heparină) se incubează cu 1 *ml* substrat ajustat pentru incubare (reactiv 7) încălzit în prealabil la 37°C. După 3 şi 33 minute de incubare la 37°C se iau cîte 0,5 *ml* din amestec şi se diluează cu 0,5 *ml* apă distilată, iar 0,5 *ml* din amestecul diluat se trec în cîte o eprubetă cu dop rodat conţinînd 3 *ml* amestec de extracţie Dole. Se agită 20—30 secunde pentru extracţia AGL. Se adaugă apoi 3,5 *ml* heptan şi 5 *ml* H_2O agitîndu-se bine timp de 3 minute. Se aşteaptă separarea şi clarificarea stratului superior heptanic. Se pipetează apoi cu grijă 1,2 *ml* din faza heptanică şi se amestecă cu 1,8 *ml* reactiv cloroform-heptan (vezi pag. 187) şi 2 *ml* reactiv cobaltic (vezi pag. 187). Se procedează în continuare la dozarea AGL după metoda Novak (vezi pag. 187).

$$\text{Activitatea lipolitică (Moli/}ml/min) = \frac{(\text{AGL eliberaţi la 33 } min) - (\text{AGL elib. la 3 } min)}{\text{Timpul de incubare}} \times \text{Diluţia plasmei}$$

Scanned with OKEN Scanner

De exemplu la 3 *min* —0,5 μ*Eq* AGL/*ml* (respectiv 1 μ*Eq*/*ml*, ţinîndu-se cont de diluţia amestecului.

La 33 *min* — 1,9 μ*Eq* AGL/*ml* (respectiv 3,8 μ*Eq*/*ml*)

$$\frac{(3{,}8 - 1) \times 3}{30} = 0{,}28 \ \mu Eq/ml/\text{minut}$$

Este bine ca la fiecare serie de determinări să se execute cel puţin două determinări din soluţia standard de acid palmitic (vezi pag. 188) corespunzînd la 0,5 şi 1 μ*Eq*/*ml* şi preparate în condiţii identice cu probele de analizat.

Interpretare. Valorile normale sînt de 0,15—0,35 μ*Eq*/*ml*/*min*. Activitatea lipolitică postheparinică scade în unele forme de hiperlipemie (vezi pag. 202), şi în special în hiperlipemia de tip I, unde poate fi nulă. Recent s-a precizat că activitatea lipolitică postheparinică se datoreşte nu numai lipoproteinlipozei (inhibabilă prin sulfat de protamină) ci şi unor lipaze (de ex. lipaza hepatică).

BIBLIOGRAFIE

Cucuianu, M., Popescu, T. A., Opincaru, A., Journal of Atherosclerosis Research, 1968, 8, 215.

8.15. Determinarea activităţii lecitin-colesterol aciltransferazei (LCAT)

Lecitin-colesterol aciltransferaza (LCAT) este o enzimă produsă de ficat care catalizează transferul unui acid gras din molecula de lecitină pe colesterolul liber producînd esterificarea acestuia.

Lecitină + colesterol liber → lizolecitină + colesterol esterificat

În principiu determinarea activităţii LCAT se bazează pe măsurarea capacităţii serului de a esterifica un substrat de colesterol marcat. Întrucît enzima acţionează asupra substratului incorporat în lipoproteine, într-o primă etapă este necesară incorporarea colesterolului marcat în lipoproteine. În acest scop se dizolvă în 10 *ml* cloroform 25 μ*Ci* 4-^{14}C-colesterol şi 10 *mg* colesterol nemarcat şi se amestecă apoi cu 2 g particule de celită-545 (Fisher Scientific Corporation). Se evaporează apoi solventul astfel încît colesterolul rămîne adsorbit pe particulele de celită. Aceste particule se agită apoi timp de 20 ore cu ser încălzit în prealabil timp de 30 minute la 56°C pentru inactivarea enzimei. Se folosesc 50 *mg* celită pentru 1 *ml* ser substrat. Particulele de celită

Scanned with OKEN Scanner

se îndepărtează apoi prin centrifugare. Acest substrat se poate păstra timp de 90 zile la —30°C. În continuare se amestecă 0,5 *ml* din substratul astfel preparat cu 0,2 *ml* din serul de analizat şi se incubează la 37°C, timp de 24 de ore, pentru desfăşurarea reacţiei enzimatice. Se pipetează 0,5 *ml* din amestec şi se extrag lipidele (vezi pag. 172). Se iau apoi 1,5 *ml* din faza conţinînd lipide şi se evaporă la sec. Lipidele redizolvate în cloroform sînt apoi cromatografiate pe plăci de silicagel-G (vezi pag. 72) folosind ca solvent sistemul eter de petrol—eter etilic—acid acetic glacial, în proporţie de 90:15:1,5. Zonele conţinînd colesterol şi esteri de colesterol sînt puse în evidenţă prin expunerea la vapori de iod fiind apoi raclate de pe lamă şi trecute în fiole după sublimarea iodului. Se tratează apoi cu lichid de scintilaţie şi se determină radioactivitatea. Pe baza concentraţiei iniţiale de colesterol liber în amestecul de incubaţie şi a procentului radioactivităţii incorporate în esterii de colesterol, activitatea LCAT se calculează ca micrograme colesterol esterificat de 1 *ml* ser pe timp de o oră. Valorile normale sînt de 20—30 μg/*ml*/oră. LCAT scade în afecţiunile hepatice şi creşte în hiperlipemii.

Date fiind complexitatea metodei şi a reactivilor necesari determinările de LCAT se fac doar în scop de cercetare. Am redat succint metoda de dozare a LCAT în special spre a ilustra îmbinarea unei metode enzimatice cu separările cromatografice şi tehnicile izotopice. Pentru detalii indicăm bibliografia.

BIBLIOGRAFIE

Glomset, I. A., J. Lipid Res., 1968, 9, 155. Simon, I. B. and Scheig, R., New. Eng. J. Med., 283, 1970, 841. Marcel, Y. L., Fabien, H. D., Davignon, J., Lipids, 6, 1971, p. 722.

8.16. | Interpretarea modificărilor enzimelor serice

În condiţii fiziologice, majoritatea procedeelor enzimatice au loc la nivelul celulelor, iar laboratorul clinic încearcă să contribuie la problemele de diagnostic pe baza determinărilor de enzime efectuate în serul sanguin. Pentru interpretarea modificărilor suferite de enzimele serice în condiţii patologice este necesară cunoaşterea locului de producere al diverselor enzime, mecanismele prin care diversele enzime ajung din celule în sînge şi soarta enzimelor trecute din celule în sînge. Din

Scanned with OKEN Scanner

punct de vedere al diagnosticului clinic enzimele din ser pot fi clasificate în următoarele categorii:

a) *Enzime secretate activ în plasmă* mai ales de către ficat şi care de regulă acţionează asupra unor substrate din plasmă îndeplinind un rol fiziologic la acest nivel. Astfel de enzime plasmatice funcţionale sînt enzimele cu rol în coagulare şi fibrinoliză, pseudocolinesteraza şi, lecitin colesterol acil-transferaza (enzima de esterificare a colesterolului). Scăderea acestor enzime în plasmă denotă de obicei o insuficienţă funcţională a organului producător.

b) *Enzime ale secreţiilor exocrine* care pot difuza pasiv în sînge fără a avea vreun rol la acest nivel. Astfel de enzime sînt amilaza, lipaza şi tripsina pancreatică, pepsinogenul gastric precum şi fosfataza alcalină biliară şi fosfataza acidă prostatică. Astfel de enzime scad în sînge în caz de atrofie a organului producător dar aceste modificări sînt necaracteristice. Creşteri semnificative dar trecătoare se întîlnesc însă în caz de leziuni ale celulelor producătoare (creşterea permeabilităţii membranei celulare sau chiar necroze celulare) sau în caz de obstrucţii ale canalelor excretoare.

c) *Enzime celulare* acţionînd exclusiv intracelular şi a căror substrat şi cofactori nu se găsesc în plasmă. Astfel de enzime denumite şi enzime plasmatice nefuncţionale se găsesc în plasmă în cantităţi mult mai mici decît în celule (uneori de sute de mii de ori mai puţin). Ca exemple de enzime celulare citărn aminotransferazele (transaminazele), lacticodehidrogenaza, aldolaza, sorbitoldehidrogenaza, ornitincarbamiltransferaza, creatinfosfokinaza, glutamat dehidrogenaza.

Trecerea acestor enzime din celule în plasmă implică o creştere a permeabilităţii membranelor celulare care denotă de regulă o leziune a celulelor fără a implica însă neapărat o necroză. Modificarea concentraţiei plasmatice a enzimelor celulare depinde de: *1*) echipamentul enzimatic al organului lezat; *2*) localizarea intracelulară a enzimelor (citoplasmatică sau mitocondrială) şi gradul de lezare al membranelor celulare sau mitocondriale; *3*) gradul de vascularizaţie al organului lezat; *4*) prezenţa sau absenţa unei bariere inflamatorii; *5*) solubilitatea enzimei în lichidul extracelular; *6*) viteza de degradare sau excreţie a enzimei.

În tabelul 19 redăm o prezentare sintetică a semiologiei cîtorva enzime mai frecvent utilizate în diagnosticul de laborator.

Ca bibliografie se indică lucrările apărute în *Praktische Enzymologie*, Ed. Hans Huber, Bern und Stuttgart, 1968 şi monografia *Pseudocholinesterasen Pharmakogenetic, Biochemie Klinick* de H. W. Goedde, A. Doenicke şi K. Altland Ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.

Scanned with OKEN Scanner

TABEL 19

SEMIOLOGIA UNOR ENZIME MAI FRECVENT UTILIZATE ÎN DIAGNOSTICUL CLINIC

Enzime	*Loc de producere*	*Modificări în condiţii patologice*	*Observaţii*
Transaminaza glutamic-oxal-acetică (aspartaminotransferaza, GOT)	Musculatură, Miocard Ficat (60% în citoplasmă şi 40% în mitocondrii	Creşteri marcate (de 10—100 × valorile normale) în infractul miocardic, hepatita virală acută, necroza toxică a ficatului. Creşteri moderate în evoluţia hepatitelor cronice, ictere mecanice, mononucleoza infecţioasă, anemii hemolitice severe, boli ale musculaturii striate.	Raportul GOT/GPT constituie coeficientul De Ritis fiind cam de 1.3 la normali. În leziunile inflamatorii ale ficatului acest coeficient scade datorită creşterii mult mai exprimate a GPT decît a GOT. În leziunile necrotice creşte mai mult GOT iar raportul GOT/GPT creşte. Hemoliza duce la creşteri ale GOT.
Transaminaza glutamic-piruvică (alanin-aminotransferaza GPT)	În special în ficat. Cantităţi mult mai reduse în musculatură, miocard, rinichi şi pancreas.	Creşteri marcate (de aproape 100 × valorile normale) în hepatita virotică acută şi necroza toxică a ficatului. Creşteri moderate în hepatita cronică şi ciroze, ficatul de stază cardiacă (instalată acut) mononucleoza infecţioasă.	
Lacticodehidrogenaza (LDH)	În musculatură miocard, ficat, ganglionii limfatici.	Creşteri marcate se constată în infarctul miocardic, necroza toxică a ficatului şi în unele afecţiuni hematologice (anemia de tip Biermer şi leucemiile) Creşteri moderate în hepatita virotică, boli ale musculaturii striate şi în impregnarea tumorală.	LDH poate fi separată electroforetic în 5 izoenzime: LDH—1 şi LDH—2 sînt de proveniență miocardică iar LDH—5 provine din ficat. Enzima se inactivează la temperaturi scăzute
Creatin-fosfokinaza (CPK)	Musculatură, miocard şi creier	Creşteri marcate în infarctul miocardic şi distrofia musculară progresivă. creşteri moderate în distrucţii ale mulsculaturii, după intervenţii chirurgicale la lehuze, în hipo-	Creşterea CPK în infarctul miocardic survine mai precoce decît creşterea GOT sau LDH În schimb creşterea LDH e mai persistentă.

Scanned with OKEN Scanner

		tiroidism (cînd catabolismul enzimei este încetinit).	
Amilaza	Pancreas, glandele salivare. Se produce şi în ficat.	Creşteri marcate în pancreatita acută (leziunea celulelor) şi în uremie (lipsă de eliminare). Creşteri moderate în cancerul de cap de pancreas, afecţiuni ale glandelor salivare (parotidită, calcul salivar sau după sialografie)	Enzima se elimină prin urină astfel încît creşterile în ser sînt urmate de creşteri în urină. Leziunile pancreatice nu duc la creşteri ale amilazei dacă ţesutul pancreatic e atrofiat.
Fosfatazele alcaline	Fosfataza alcalină osoasă produsă de osteoblaşti; Fosfataza alcalină biliară produsă de epiteliul canaliculelor biliare.	Fosfataza alcalină osoasă creşte în rahitism şi osteomalacie, hiperparatiroidism, boala lui Paget, Sarcom osteogenic şi metastaze tumorale în oase. Fosfataza alcalină biliară creşte în retenţia biliară (icter mecanic, angiocolite, ciroze biliare).	Creşterile fosfatazei alcaline biliare se însoţesc de creşteri ale altor enzime eliminate prin bilă (5-nucleotidaza, leucinaminopeptidaza, ceruloplasmina gamaghitamil transferază). Creşterile în ser se datoresc nu numai retenţiei ci şi unei induceri microsomale a sintezei.
Fosfatazele acide	Cantităţi mari în prostată Cantităţi mici în ficat, eritrocite, plăcuţe sanguine şi oase.	Creşteri în carcinoamele de prostată care s-au extins dincolo de capsulă. Creşteri moderate în metastaze osoase ale tumorilor, trombocitemii, boala lui Paget şi boala lui Gaucher.	Fosfataza acidă de origine prostatică este inhibată de tartrat.
Pseudocolinesteraza (Acil-colin acilhidrolaza)	Ficat.	Scăderi marcate în insuficienţa hepatică, denutriţie gravă, intoxicaţii cu organofosforice. Scăderi moderate în anemii grave şi în reacţia de fază acută (infecţii acute, postoperator, postinfarct). Creşteri în perioade de vindecare a unei hepatite acute, în nefroze, la diabetici, obezi, hiperlipemici	Urmărirea nivelului enzimei are o valoare prognostică. Depistarea unor colinesteraze atipice are importanţă pentru anesteziologie (susceptibilitate la succinilcolină — ducînd la apnee prelungită).

Scanned with OKEN Scanner

TABEL 20

FACTORII COAGULĂRII ŞI UNELE DIN PROPRIETĂŢILE LOR CU IMPORTANŢĂ ÎN PRACTICA DE LABORATOR.

Denumirea internaţională	*Sinonime*	*Prezenţa în plasmă oxalatată*		*Prezenţa în ser*	*Dependenţă de vit. K (Afectat de dicumarol)*	*Observaţii*
		Invechită	*adsorbită*			
Factor I	Fibrinogen	+	+	–	–	Substratul coagulării
Factor II	Protrombină	+	–	10%	+	Se consumă în cursul coagulării
Factor II a	Trombină	–	–	+ tranzitoriu	–	Se inactivează în ser în decurs de 24 ore sub acţiunea antitrombinelor
Factor III	Tromboplastină tisulară	–	–	–	–	Se extrage din ţesuturi
Factor IV	Calciu ionic	–	–	+	–	Fără semnificaţie în patologia coagulării
Factor V	Procaccelerina	–	+	–	–	Se consumă în cursul coagulării
Factor VII	Proconvertină	+	–	+	+	Reţinută de filtrele Seitz
Factor VIII	Globulina antihemofilică A	–	+	–	–	Se consumă în cursul coagulării
Factor IX	Globulina antihemofilică B (Factor Christmas)	+	–	+	±	Mai activ în ser decît în plasmă
Factor X	Factor Stuart-Prower	+	– –	+	+	Reţinut de filtrele Seitz
Factor XI	Plasma Tromboplastin Antecedent.	+	+	+	–	Activat de factorul XII
Factor XII	Factor Hageman	+	+	+	–	Activare în contact cu suprafeţe umectabile
Factor XIII	Factor stabilizator al fibrinei.	parţial	+	parţial	–	Se activează sub acţiunea trombinei şi Ca++

Scanned with OKEN Scanner

9. | EXPLORAREA HEMOSTAZEI

Vorbind într-un sens larg fluiditatea sîngelui este reglată de două enzime proteolitice: trombina şi fibrinolizina. De asemenea procesele care stau la baza activării diverşilor factori ai coagulării ca şi procesul de transformare a fibrinogenului în fibrină au la bază un mecanism de: „proteoliză limitată". Tratarea metodelor de explorare a hemostazei într-un manual de metode biochimice apare astfel justificată deşi tehnicile folosite în studiul hemostazei nu sînt încă suficient de „chimizate".

9.1. | Factorii şi mecanismul coagulării*

Proteinele implicate în procesul de coagulare şi unele din proprietăţile lor cu importanţă în practica de laborator sînt trecute în tabelul 20.

Se admite că mecanismul coagulării şi reversul său fibrinoliza decurge sub forma unei cascade enzimatice reprezentată schematic în Figura 46.

Pentru laborator are importanţă faptul că diferitele etape ale procesului de coagulare pot fi explorate cu teste potrivite (fig. 47).

În general diversele sindroame hemoragipare pot fi diagnosticate cu ajutorul testelor de coagulare.

Diagnosticul de laborator al trombofiliei este mai dificil; se poate constata însă în aceste condiţii o accelerare a profazei coagulării, o modificare a funcţiilor plăcuţelor sanguine şi o încetinire a procesului de fibrinoliză.

---

*- Schemele privind teoria coagulării, tehnica şi interpretarea testelor uzuale de coagulare au fost preluate după:

- Biggs Rosemary, MacFarlane R. G. Human Blood coagulation and its disorders. Ed. Blackwell Oxford 1957.
- Hougie L. Fundamentals of blood coagulation in clinical Medicine. Ed. Mc. Graw-Hill. New-York—Toronto—London 1963.
- Jaenecke P. Antikoagulantien und Fibrinolyse-therapie. Ed. G. Thieme Stuttgart 1971.
- Perlik E. Gerinnungslaboratorium in Klinik und Praxis, Ed. G. Thieme, Leipzig 1960.
- Papilian Mihaela — Coagularea sîngelui. Ed. Academiei R.S.R. Buc. 1968.
- Von Kaulla K. Chemistry of thrombolysis, Human fibrinolytic enzymes. Ed. Ch. C. Thomas, Springfield 1963.
- Konttinen Y Fibrinolysis — Chemistry, Physiology, Pathology and Clinics. Publisher Oy Star Ab. Tampere Finland 1968.

Scanned with OKEN Scanner

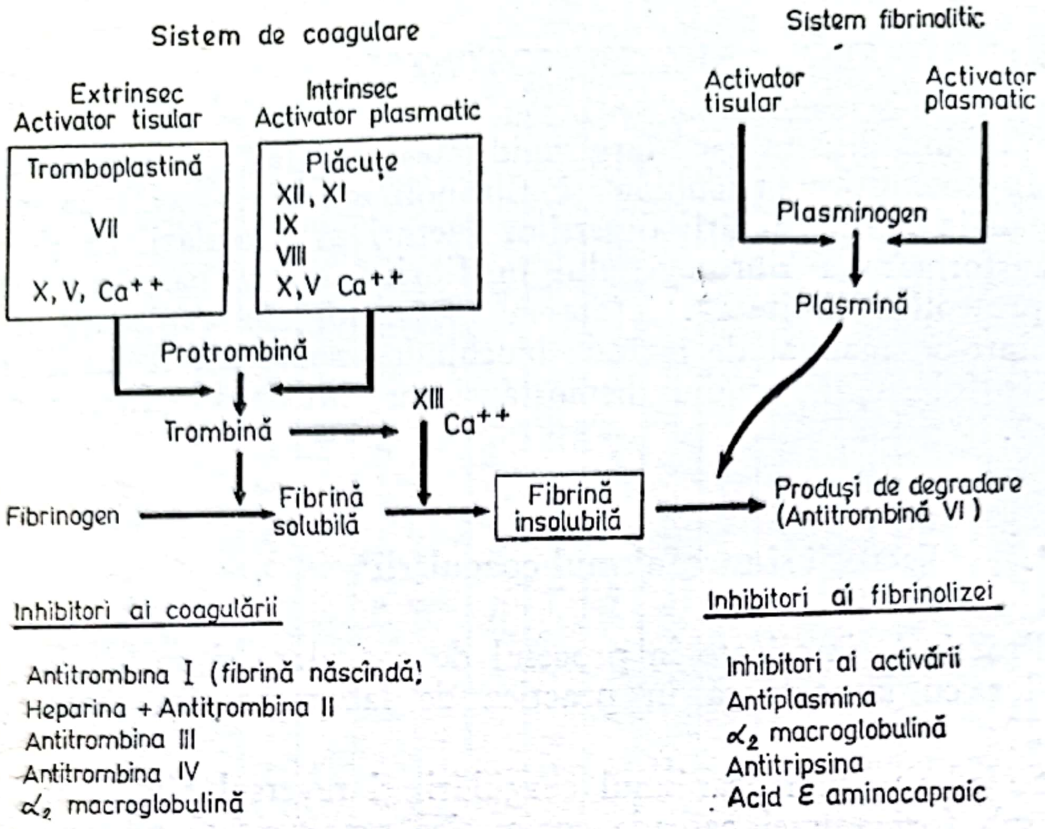


Fig. 46. Reprezentarea simplificată a mecanismului coagulării și fibrinolizei.

Mecanism patogenic	*Stări patologice în care survine*	*Fragilitate capilară. Semnul Garoului*	*Timp de sîngerare*	*Timp de coagulare (Lee-white, Howell)*
Fragilitate capilară	Scorbut, Teleangiectazie. Purpură senilă, Alergie (Henoch-Schönlein) Septicemie.	+	Normal sau crescut	Normal
Deficit în numărul sau funcția plăcuțelor sanguine	Trombocitopenie primară (Werlhof) sau secundară (în bolile măduvei osoase)	+	+	Normal sau prelungit
	Trombastenii (Von Willebrand Glanzman)	+	+	Normal sau prelungit
Defecte de coagulare	Congenitale sau cîștigate			
Deficit de fibrinogen		Normal	Normal	Prelungit
Deficit în complexul protrombic (II, V, VII, X)	Hepatopatii grave sau tratament cu dicumarol	Normal	Normal sau crescut	Normal sau crescut
Hemofilii	Mai des ereditare	Normal	Normal	Crescut
Inhibitori circulanți	Heparină sau produși de degradare ai fibrinogenului	Normal	Normal sau crescut	Crescut

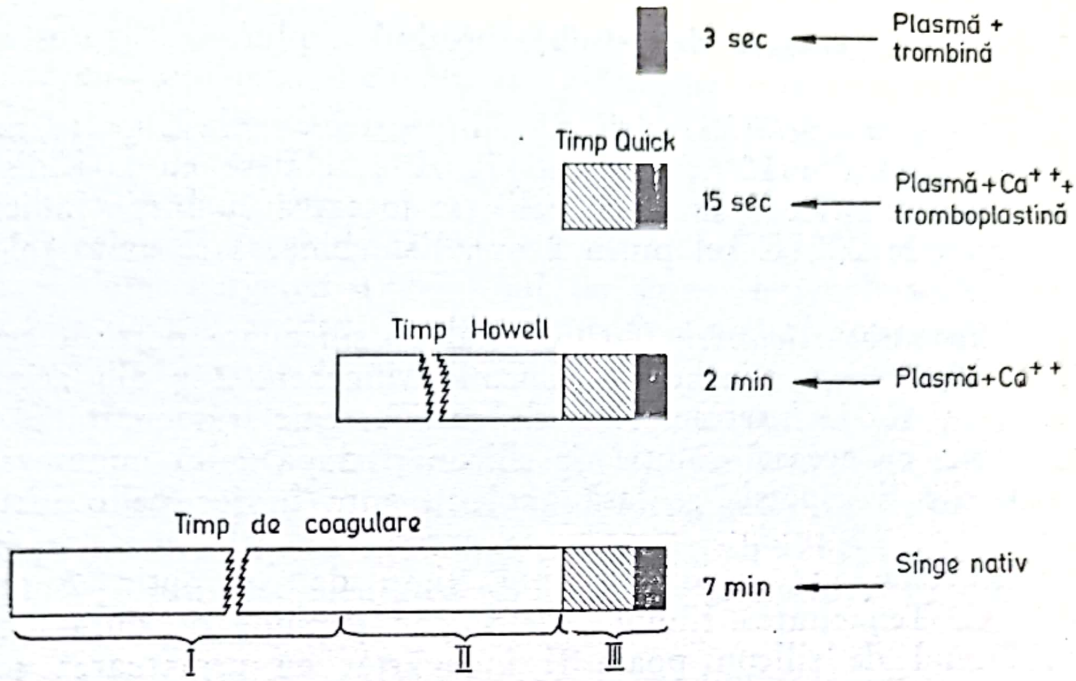


Fig. 47. Explorarea diverselor etape ale procesului de coagulare cu ajutorul testelor de uz curent.

I. Activarea factorilor de contact (aprox. 5 minute) II. Formarea tromboplastinei cu factorii de contact activaţi (durata aproximativ 1şi 45''), III. Formarea trombinei şi fibrinei (durata aprox. 1' 5'').

TABEL 21

BOLILOR HEMORAGICE MAI FRECVENTE

Numărul plăcuţelor	*Retracţia cheagului*	*Timp de trombină*	*Timp de protrombină*	*Observaţii*
Normal	Normal	Normal	Normal	În cazul septicemiilor poate coexista o coagulopatie de consumpţie cu un defect combinat al coagulării şi plăcuţelor.
Scăzut	Deficit	Normal	Normal	În trombocitopenia esenţială, măduva e bogată în megakarioci̦ţi.
Normal	Deficit	Normal	Normal	Deficit marcat în adezivitatea plachetară
Normal	Deficit	Uşor prelungit	Prelungit	Se precizează prin dozarea fibrinogenului.
Normal	Normal	Normal	Prelungit	Testul de consumaţie al protrombinei deficitar în hemofilii
Normal	Normal	Normal	Normal	Diferenţierea în tip A, B sau C după testul de generare al tromboplastinei
Normal	Normal	Crescut	Normal sau uşor crescut	

Scanned with OKEN Scanner

1. Curăţirea sticlăriei. Tuburile şi pipetele se lasă peste noapte în hidroxid de sodiu 10%, iar a doua zi se clătesc cu apă distilată pînă ce devin complet lipsite de alcalii (se încearcă cu hîrtie indicator). Se usucă apoi la 200°C cel puţin 2 ore. Este bine să se evite folosirea detergenţilor.

2. Siliconarea sticlăriei. Un material de siliconare potrivit este Siliconöl A. K. 350 — Wacker — Chemie München. 2 *g* din acest ulei se dizolvă în 100 *ml* tetraclorură de carbon. Sticlăria curăţată şi uscată se umple cu această soluţie de silicon şi după 2—3 minute se goleşte. Tuburile şi pipetele se lasă apoi cu gura în jos pe o hîrtie de filtru, timp de 15 minute, pentru ca excesul de soluţie să se scurgă. Sticlăria siliconată se încălzeşte apoi, timp de cel puţin 2 ore, la 250—300°C. Tenacitatea filmului de silicon depinde de durata acestei coaceri. Filmul de silicon poate fi îndepărtat cu următoarea soluţie: NaOH, 150 g, apă distilată, 2 litri, şi acetonă, 2 litri. Se pot folosi şi alte sorturi de silicon, procedîndu-se după indicaţiile din prospectul preparatului, întrucît concentraţia soluţiei de silicon şi durata coacerii variază de la un preparat la altul.

3. Soluţii anticoagulante. După recomandarea Comitetului Internaţional de Standardizare, soluţiile anticoagulante vor avea o concentraţie de 0,1 *mol/1.*

a. Oxalat de sodiu 0,1 mol. Se dizolvă 1,35 *g* oxalat de sodiu în 100 *ml* apă distilată.

b. Oxalat de potasiu 0,1 mol. Se dizolvă 1,4 *g* oxalat de potasiu în 100 *ml* apă distilată.

c. Citrat de sodiu 0,1 mol. Se dizolvă 2,94 *g* citrat trisodic $2H_2O$ (sau 3,57 citrat trisodic $\cdot 5^1/_2H_2O$) în 100 *ml* apă. În cazul urmăririi efectelor heparinoterapiei este de preferat utilizarea citratului ca anticoagulant.

d. Tampon acid citric-citrat de sodiu 0,1 mol. ($pH = 4{,}5$).

Se dizolvă 1,764 *g* citrat trisodic. $2H_2O$ în 60 *ml* apă distilată şi 0,8405 *g* acid citric în 40 *ml* apă distilată şi apoi se amestecă cele două soluţii.

Este bine ca soluţiile să fie *autoclavate.* Se utilizează un volum anticoagulant la 9 volume de sînge.

4. Colectarea plasmei. Se aspiră într-o seringă sterilă un volum soluţie anticoagulantă şi se puncţionează vena cu grijă şi cît mai curînd posibil după aplicarea garoului. Se aspiră apoi progresiv 9 volume de sînge (de exemplu 1 *ml* anticoagulant + 9 *ml* sînge), evitîndu-se for-

Scanned with OKEN Scanner

marea de spumă. Se trece apoi conținutul seringei într-un tub amestecîndu-se cu grije prin înclinare și evitîndu-se formarea de spumă.

În cazul urmăririi funcțiilor plăcuțelor sanguine este necesar ca recoltarea să se facă în seringi de plastic, trecîndu-se apoi în vase siliconate sau din plastic. Recoltarea se poate efectua și fără seringă. În acest caz se punctionează o venă cu un ac de puncție venoasă siliconat și după curgerea a 2—3 *ml* de sînge se recoltează 9 *ml* sînge direct într-un tub gradat siliconat conținînd un *ml* anticoagulant, amestecîndu-se prin înclinarea tubului.

Sîngele prelevat este centrifugat cît mai curînd de la recoltare la 3000 ture pe minut, timp de 10 minute. Pentru a se evita sedimentarea sau distrugerea trombocitelor se recomandă centrifugarea la 800 turații pe minut timp de 10 minute; separarea plasmei bogate în plăcuțe se obține și prin sedimentarea spontană a hematiilor în tuburi înclinate într-un unghi de 45°.

5. Alte materiale mai des folosite în studiul coagulării.

a. Clorură de calciu, 0,025 *mol* (Mol/40). Se dizolvă 2,7775 *g* clorură de calciu anhidră în 1000 *ml* apă distilată. Cîntărirea se face cît mai rapid posibil întrucît clorura de calciu este foarte higroscopică.

b. Tampon medinal-acetat (*pH*=7,6). Se dizolvă 1,471 *g* me— (dietilbarbiturat de Na) și 0,971 *g* acetat de sodiu·$3H_2O$ în 50 *ml* apă distilată. Se adaugă 48 *ml* HCl 0,1 *N* și se completează la 250 *ml* cu apă distilată. *pH*-ul trebuie controlat la *pH*-metru și ajustat la nevoie.

c. Tampon Tris (*pH* =7,6). Se dizolvă 2,4 *g* Trihidroximetilaminometan în 50 *ml* apă distilată. Se ajustează *pH* la 7,6 cu acid clorhidric 0,1 *N* și se completează la 100 *ml* cu apă distilată.

d. Sulfat de bariu, pentru absorbția factorilor II, VII, IX, X. 10 *g* SO_4Ba se suspendă în 100 *ml* apă distilată, se agită bine și se lasă să stea peste noapte. Se centrifughează, iar supernatantul se îndepărtează suspendîndu-se apoi din nou în același volum de apă distilată.

e. Plasmă adsorbită cu sulfat de bariu. 2 *ml* suspensie de sulfat de bariu se centrifughează la 3500 turații pe minut timp de 10 minute. Se îndepărtează supernatantul și se lasă eprubeta cu gura în jos pentru scurgerea lichidului rămas. Se adaugă apoi 2 *ml* plasmă și se agită bine timp de 15 minute la temperatura camerei. Se centrifughează din nou la 3500 turații pe minut, timp de 10 minute. Plasma este lipsită de factorii II, VII, IX și X. Dat fiindcă factorii V și VIII rămași în plasmă sînt labili, plasma se va folosi cît mai curînd după preparare. Păstrarea unei astfel de plasme se va face la —20°C.

Scanned with OKEN Scanner

f. Plasmă învechită (lipsită de factor V). Plasma normală oxalatată se ţine în frigider la +4°C pînă cînd timpul de protrombină (la adaus de tromboplastină şi $CaCl_2$) ajunge la peste 60 de secunde. De regulă este nevoie de 2—3 săptămîni. Procesul de îndepărtare a factorului V poate fi accelerat barbotîndu-se oxigen prin plasmă timp de 2—8 ore.

g. Ser. Se recoltează sînge 10—15 *ml* într-un balon Erlenmeyer de 50—100 *ml* conţinînd cîteva perle de sticlă. Balonul se rotează cu grijă în timp ce sîngele se coagulează, urmărindu-se ca prin acest procedeu să se activeze factorii de contact şi să crească consumul de protrombină. Sîngele coagulat se păstrează la 37°C cel puţin 2 ore, iar apoi se trece într-o eprubetă de centrifugă şi se separă serul prin centrifugare timp de 20 de minute la 3000 de turaţii pe minut. Serul supernatant trebuie să fie lipsit de trombină. Dacă mai conţine trombină (coagulează o soluţie de fibrinogen bovin), se continuă incubarea la 37°C încă cel puţin 30 minute sau 24 *h* la frigider (+4°C).

h. Plasmă lipsită de factorul VII. Se filtrează printr-un filtru Seitz cu un conţinut de azbest de 20%, plasmă oxalatată de bou. Se refiltrează printr-un filtru Seitz cu 30% azbest aruncîndu-se primii 10—15 *ml* care au un conţinut foarte scăzut de protrombină. Plasma filtrată prin azbest este complet lipsită de factorul VII, dar este totodată foarte săracă în factorul X, iar conţinutul de protrombină este de aproximativ 30% din cantitatea normală la om. Timpul Quick determinat pe o astfel de plasmă trebuie să fie de peste un minut.

i. Suspensie de trombocite ca sursă de factor plachetar 3. 9 *ml* sînge venos se colectează într-un tub siliconat conţinînd 1 *ml* citrat de sodiu 0,1 *M*. Se centrifughează la 800—1000 turaţii pe minut timp de 10 minute. Plasma bogată în trombocite se transferă într-un tub siliconat cu ajutorul unei pipete siliconate şi se centrifughează din nou la 3000 turaţii pe minut, timp de 15 minute. Plasma supernatantă se îndepărtează, iar plăcuţele sedimentate sînt suspendate cu grijă în 5 *ml* ser fiziologic şi apoi resedimentate prin centrifugare. Procesul de spălare se repetă de 3 ori. După ultima spălare se suspendă trombocitele în 3 *ml* ser fiziologic şi se amestecă cu un beţigaş de lemn. Omogenizarea trombocitelor se poate efectua şi prin îngheţări repetate la —25°C (de exemplu în amestec refrigerent de cloroform şi zăpadă carbonică), urmate de topiri la 37°C.

j. Tromboplastină. Extract tisular. Creierul, (de exemplu creier de iepure) se curăţă bine de meninge şi de vase la un interval de timp cît mai scurt de la prelevarea lui din cutia craniană. Se cîntăreşte. Se mojarează pînă se obţine o pastă şi apoi se adaugă treptat ser fizio-

Scanned with OKEN Scanner

logic conţinînd 0,6% acid fenic. Pentru un gram de creier se adaugă 20 *ml* ser fiziologic fenicat. Se filtrează printr-un strat dublu de tifon. Se păstrează la +4°C timp de cîteva luni. Îngheţarea suspensiei duce la inactivarea ei.

k. Preparatele de tromboplastină uscată înfiolate. Pot fi obţinute ca preparate comerciale sau pot fi efectuate în laborator. Ele nu au avantajul faţă de tromboplastina preparată prin emulsionarea creierului în ser fiziologic fenicat. Pulberea de creier se obţine prin triturarea cu acetonă a creierului curăţat de vase şi meninge. Se schimbă acetona de cîteva ori iar creierul triturat se usucă în exicator.

Orice preparat de tromboplastină trebuie testat pe un număr de plasme normale.

l. Extract cloroformic de creier se obţine agitînd timp de 20 minute pulberea de creier (k) cu cloroform (2 *ml* cloroform pentru 1 g pulbere de creier). Se filtrează apoi cu grijă printr-o hîrtie de filtru densă, spălîndu-se cu cloroform. Soluţia cloroformică gălbuie obţinută prin filtrare se evaporează la sec pe baie de apă la 56—60°. Extractul astfel obţinut din 1 g creier uscat se suspendă în 0,1 *ml* ser fiziologic. Se diluează apoi de 20—50 ori cu ser fiziologic se împarte în porţiuni mici şi se păstrează la —20°C. Se foloseşte ca sursă de fosfolipide în testul de generare al tromboplatinei sau pentru dozarea factorilor antihemofilici. În acest caz se diluează înainte de utilizare 1/100 cu tampon barbituric.

Metode de orientare clinică

Expunem în cele ce urmează cîteva teste uzuale care pot fi efectuate în orice laborator şi care în general sînt suficiente pentru diagnosticarea unui sindrom hemoragipar şi pentru conducerea tratamentului anticoagulant şi fibrinolitic.

9.3. Timpul de sîngerare (Duke) orientează asupra hemostazei în general

Tehnică. După curăţirea pielii cu alcool sau eter se face o înţepătură cu o adîncime de aproximativ 4 *mm* în lobul urechii cu ajutorul unei lanţete. La fiecare 30 de secunde se îndepărtează sîngele care curge din înţepătură cu hîrtie de filtru, avîndu-se grijă ca aceasta

Scanned with OKEN Scanner

să nu atingă plaga. Se notează timpul de la înţepătură pînă la încetarea sîngerării. Normal 3—5 minute.

Notă. Tromboplastina tisulară eliberată poate da un timp normal de sîngerare chiar în cazuri de hemofilie severă.

9.4. | Timpul de sîngerare primară şi secundară (Borchgrevink şi Waaler)

a. Timpul de sîngerare primară. Cu ajutorul unui scalpel se face o incizie lungă de 12—14 *mm* pe pielea toracelui sau a antebraţului. Sîngele care curge este şters cu hîrtie de filtru la fiecare 30 de secunde, avîndu-se grijă să nu se atingă incizia. Se notează timpul scurs de la efectuarea inciziei pînă la oprirea hemoragiei.

b. Timpul de sîngerare secundară. După 24 ore se îndepărtează cu grijă, cu ajutorul unui scalpel, crusta făcută la suprafaţa inciziei avîndu-se grijă să nu lezeze ţesuturile sau vreun vas. Se notează durata hemoragiei secundare produsă prin îndepărtarea crustei.

Valori normale: timpul de sîngerare primară pînă la 7 minute, timpul de sîngerare secundară pînă la 2 minute.

Interpretare. 1. Timp de sîngerare primară anormal crescut şi un timp de sîngerare secundară normal pledează pentru o dereglare a sistemului extrinsec de coagulare.

2. Un timp de sîngerare primară normal sau doar uşor prelungit, asociat cu o prelungire considerabilă a timpului de sîngerare secundară, orientează înspre o anomalie a sistemului intrinsec de coagulare.

3. Anomalii ale plăcuţelor sanguine, pot duce atît la prelungirea timpului de sîngerare primară, cît şi a timpului de sîngerare secundară.

Notă. Întrucît acest test dă rezultate anormale chiar în cazuri uşoare de hemofilie, el este superior testului Duke, ca şi probă de orientare clinică.

9.5. | Testul garoului (Rumpel—Leede)

Se aplică manşeta tensiometrului pe braţ şi se realizează o compresiune la un nivel aflat între presiunea arterială maximă şi minimă pe un interval de timp ce nu va depăşi 5 minute.

După încetarea comprimării se examinează pielea dedesubtul marginii inferioare a manşetei. În mod normal numărul peteşiilor nu depăşeşte 2—3/cm^2 de piele. Creşterea numărului de peteşii indică o fragilitate capilară.

Scanned with OKEN Scanner

9.6. | Numărul plăcuţelor sanguine

Într-o pipetă Potain de hematii se recoltează sînge capilar (sau mai bine sînge venos recoltat cu anticoagulant într-un vas siliconat) pînă la diviziunea 1, aspirîndu-se apoi oxalat de amoniu 1% la diviziunea 101 (soluţia se păstrează nelimitat la +4°C, dar trebuie filtrată pentru îndepărtarea impurităţilor). Se agită bine şi se lasă cel puţin 5 minute pentru producerea hemolizei. Se îndepărtează jumătate din conţinutul pipetei iar cu restul se umple camera de numărat Thoma. Se lasă camera de numărat timp de 20 minute într-o cameră umedă. Cînd trombocitele s-au sedimentat ele pot fi numărate. Sub microscop ele apar ca nişte corpusculi rotunzi, refringenţi. Numărul de plăcuţe de pe întreaga cameră (1 mm^2) înmulţit cu o mie dă cifra plăcuţelor sanguine pe 1 μl sînge. De regulă se numără plăcuţele de pe 5 pătrate mari, iar suma obţinută se înmulţeşte cu 5000.

Valori normale 150.000—350.000 plăcuţe pe μl sînge. În plasma bogată în trombocite obţinută prin sedimentarea hematiilor numărul normal de plăcuţe este de 200.000—400.000.

9.7. | Timpul de coagulare (Lee şi White)

Imediat după aplicarea garoului se recoltează 4—5 *ml* sînge într-o seringă uscată şi se trece cîte 1 *ml* sînge în 4 eprubete Wasserman ţinute pe o baie de apă la 37°C. Eprubetele sînt scoase din baie la fiecare 30 secunde şi înclinate. Timpul de coagulare se consideră intervalul între pătrunderea sîngelui în seringă şi momentul în care sîngele nu mai curge la înclinarea eprubetei. Ca rezultat se ia o medie a timpului de coagulare în cele 4 tuburi.

Valori normale: 5—7 minute.

Interpretare. Prelungirea T.C. denotă de regulă un deficit al sistemului intrinsec de coagulare. Testul este foarte puţin sensibil astfel încît multe coagulopatii pot rămîne nedepistate. Timpul de coagulare poate fi scurtat în mod fals prin formarea de spumă, recoltarea înceată a sîngelui în seringă sau contaminarea cu tromboplastină tisulară.

9.8. | Timpul de recalcificare (Howell)

Se poate efectua din sînge integral recoltat cu anticoagulant sau din plasmă obţinută aşa cum s-a arătat mai sus. Se iau 0,2 *ml* sînge sau plasmă citratată şi se incubează 30 secunde la 37°C după care se

Scanned with OKEN Scanner

adaugă 0,2 *ml* $CaCl_2$ 0,025 *M*. Se înclină eprubeta urmărindu-se momentul apariţiei primelor filamente de fibrină. Perlick recomandă ca în cazul plasmei să se folosească amestecul de 0,1 *ml* plasmă citratată + 0,1 *ml* H_2O + 0,1 *ml* $CaCl_2$.

Valori normale: 90—160 secunde.

Interpretare. Interpretarea este aceeaşi ca şi în cazul timpului de coagulare avînd însă avantajul de a fi o probă mai uşor de standardizat şi mai sensibilă. Cu toate acestea unele forme uşoare de hemofilie rămîn nedepistate.

Surse de eroare. Aceleaşi ca şi în cazul timpului de coagulare. În plus timpul de recalcificare al plasmei depinde de conţinutul de plăcuţe şi deci de intensitatea centrifugării. Plasmele cu un conţinut scăzut de plăcuţe dau un timp de recalcificare prelungit. În cazul urmăririi efectelor tratamentului cu heparină se recomandă folosirea ca anticoagulant a citratului de sodiu deoarece oxalatul poate masca heparina. Un tratament eficace cu heparină duce la creşterea timpului Howell cu $1^1/_2$ pînă la 2 ori valorile iniţiale (ajungînd adică la 4—5 minute).

9.9. | Testul de toleranţă la heparină

Se prepară o soluţie stoc de heparină (50 *u/ml*) amestecîndu-se 0,2 *ml* heparină comercială cu 19,8 *ml* apă distilată. Această soluţie stoc se poate păstra 4—6 săptămîni la +4°C. Din soluţia de 50 *u/ml* se iau 0,2 *ml* şi se amestecă cu 9,8 *ml* $CaCl_2$ 0,025 *M* obţinîndu-se o soluţie ce conţine *1 u* heparină/*ml*. Prin amestecarea a 2 *ml* din soluţia precedentă cu 8 *ml* $CaCl_2$ 0,025 *M* se ajunge la soluţia de lucru conţinînd 0,2 *u/ml*. Testarea rezistenţei la heparină se face amestecîndu-se 0,5 *ml* sînge citratat preîncălzit la 37°C cu 0,5 *ml* soluţie heparină 0,2 *u/ml*, de asemeni preîncălzită. Se notează timpul de la formarea amestecului şi pînă la coagularea acestuia. La normali acest timp este de 135—165 secunde.

De remarcat că spre deosebire de soluţia stoc, soluţiile diluate de heparină (soluţiile de lucru) sînt instabile şi trebuiesc preparate proaspăt.

Interpretare. Adausul de heparină accentuează orice anomalie minoră a procesului de coagulare care ar fi putut trece neobservată la efectuarea unui simplu test de recalcificare.

Scanned with OKEN Scanner

9.10. | Timpul de protrombină (Quick)

Într-o eprubetă serologică se adaugă pe rînd 0,1 *ml* Cl_2Ca 0,025 *M* şi 0,1 *ml* tromboplasină. După o incubare de 1—2 minute pe baie de apă la 37°C se adaugă rapid 0,1 *ml* plasmă oxalatată sau citratată preîncălzită la 37°C, notîndu-se timpul necesar pentru formarea unui cheag.

Valorile normale depind de sursa de tromboplastină. Mai corect este să se stabilească pentru tromboplastina cu care se lucrează o curbă de calibrare cu plasmă normală, determinîndu-se timpul de protrombină la diluţii de 100% (1/1), 50% (1/2), 25% (1/4) şi 12,5% (1/8) de plasmă normală (mai bine un amestec de plasmă obţinută de la 5 donatori sănătoşi). Diluţiile se efectuează cu ser fiziologic. Lucrîndu-se cu o tromboplastină de bună calitate o concentraţie a complexului protrombinic de 100% dă un timp de protrombină de 13,5—15,5 secunde, pentru 50%, timpul este de 17—20 secunde, pentru 25%, 26—30 secunde iar pentru 12,5% 47—48 de secunde. Curba de calibrare poate fi reprezentată grafic mai bine pe o hîrtie dublu logaritmică (vezi fig. 48).

Valorile se exprimă mai corect ca indice de protrombină adică în procente ale normalului (normal 80—120%). Rezultatele se pot exprima şi direct în secunde, în acest caz trecîndu-se însă în paranteză valorile obţinute la plasma normală.

Interpretare. Timpul de protrombină este un test de orientare pentru depistarea anomaliilor în sistemul extrinsec de coagulare (factorii I, II, V, VII, X), alcătuind aşa-zisul complex protrombinic. Este

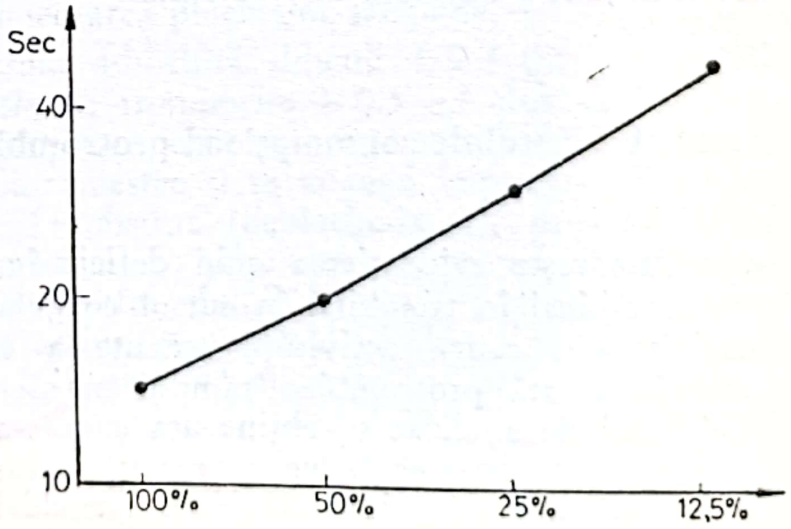


Fig. 48. Curba de calibrare pentru exprimarea procentuală a timpului de protrombină (indicele de protrombină). Pe abscisă indicele de protrombină (corespunzînd procentului de plasmă normală în amestecul în care se face testarea. Reprezentare logaritmică. Pe ordonată: timpii obţinuţi pînă la apariţia primelor filamente de fibrină în cursul determinării timpului de protrombină (*T.*Quick). Reprezentare logaritmică.

extrem de util pentru urmărirea tratamentului cu preparate cumarinice, care duce la scăderea factorilor mai sus menţionaţi. Un tratament anticoagulant eficace trebuie să menţină indicele de protrombină între 12—25%.

9.11. | Timpul de trombină

Se foloseşte o sursă de trombină cu activitate cunoscută (de exemplu Test—Thrombin Behringwerke, conţinînd 60 *u* N.I.H. trombină pe flacon). Conţinutul unui flacon se dizolvă într-un *ml* apă distilată. Această soluţie stoc se poate păstra 8 ore la temperatura camerei şi aproximativ 2 zile la +4°C, fără pierderea activităţii. Înainte de efectuarea testului o cantitate mică de trombină stoc se diluează de 10 ori cu apă distilată, ajungîndu-se la o concentraţie de 6 *u* N.I.H. (de exemplu 0,1 soluţie stoc de trombină + 0,9 *ml* apă distilată). Testarea se efectuează punînd într-o eprubetă 0,1 *ml* plasmă citratată care se incubează 20—30 secunde la 37°C cu 0,1 *ml* apă distilată. Se adaugă apoi 0,1 *ml* soluţie diluată de trombină, notîndu-se timpul necesar pentru formarea unui cheag.

Valori normale: 17—24 secunde.

Interpretare. Timpul de trombină este utilizat pentru a detecta un deficit de fibrinogen sau a unor inhibitori ai trombinei cum ar fi produşii de degradare ai fibrinei şi heparina. Timpul de trombină s-a dovedit extrem de util pentru conducerea tratamentului cu streptokinază. Un tratament eficace cu streptokinază, prin produşii de liză ai fibrinei şi fibrinogenului, trebuie să ducă la prelungirea de 2—4 ori a valorii iniţiale a timpului de trombină.

9.12. | Testul de consumpţie al protrombinei

Urmăreşte evidenţierea unui deficit în procesul de transformare a protrombinei în trombină în cursul coagulării. Cînd acest proces este încetinit, din cauza activităţii scăzute a tromboplastinei plasmatice, poate fi testată protrombina rămasă în ser după coagularea sîngelui.

Serul de analizat se obţine aşa cum s-a arătat la pag. 344 avîndu-se grijă ca în sîngele venos recoltat să se producă o activare cît mai completă a coagulării. După 4 ore de la coagulare se iau într-o

Scanned with OKEN Scanner

eprubetă 0,1 *ml* ser şi 0,1 *ml* tromboplastină. Se lasă pe baia de apă 60 de secunde timp necesar ca toată protrombina să se transforme în trombină. După acest interval se adaugă 0,2 *ml* sursă de fibrinogen. Se cronometrează timpul de coagulare al amestecului. Ca sursă de fibrinogen poate fi folosită o soluţie standard de fibrinogen 200 *mg%* sau plasmă adsorbită cu sulfat de bariu (vezi pag. 343).

Valorile normale sînt de peste 45 secunde. Scurtarea timpului indică un deficit al consumării protrombinei aşa cum se întîlneşte în dereglările sistemului coagulant intrinsec. Cu această metodă se depistează şi formele puţin exprimate ale diverselor tipuri de hemofilie.

9.13. | Testul de generare a tromboplastinei (Biggs—Douglas)

Urmăreşte viteza de activare a sistemului coagulant intrinsec într-un amestec ce conţine toţi factorii ce iau parte la formarea tromboplastinei plasmatice. Tromboplastina plasmatică produsă în amestec se testează prin efectul său coagulant asupra unei plasme substrat.

Prepararea reactivilor speciali şi anume: a. suspensie de trombocite diluată 1/3 ca sursă de factor plachetar 3. b. ser normal diluat 1/10 (sursă de factori VII, IX, X, XI, XII), şi plasmă adsorbită cu sulfat de bariu şi diluată 1/5 (ca sursă de factori V, VIII, XI, XII) a fost descrisă anterior (vezi pag. 343). Este bine ca serul să fie diluat cu tampon acetat-medinal, cu cel puţin 1—2 ore înainte de utilizare.

Ca plasmă substrat (sursă de factor II şi fibrinogen) poate fi folosită plasma oxalatată sau citratată, centrifugată 15—20 *min.* la 3000 turaţii pe minut pentru sedimentarea plăcuţelor sanguine.

Tehnica: 0,3 *ml* plasmă adsorbită diluată 1/5 + 0,3 *ml* ser diluat 1/10 + 0,3 *ml* suspensie de trombocite + 0,3 *ml* clorură de calciu se pun la incubat la 37°C şi se porneşte cronometrul. Din minut în minut se iau cîte 0,1 *ml* din amestec şi se adaugă împreună cu 0,1 *ml* Cl_2Ca peste 0,1 *ml* plasmă substrat (deplachetizată), preîncălzită la 37°C. Se porneşte un alt cronometru şi se notează timpul de coagulare în fiecare tub, obţinîndu-se astfel timpii necesari pentru coagularea plasmei substrat la care s-a adăugat amestecul incubat timp de 1, 2, 3, 4, 5 şi 6 minute. Rezultatele ilustrative obţinute în condiţii normale şi în diverse condiţii patologice sînt redate în tabelul 22.

Aşa cum reiese din tabelul 22 testul de generare al tromboplastinei este în măsură să facă diagnosticul tipului de hemofilie.

Scanned with OKEN Scanner

TABEL 22

TESTUL DE GENERARE A TROMBOPLASTINEI ÎN DIFERITE STĂRI (EXEMPLE ILUSTRATICE*)

Situație	*Sursă de trombocite*	*Sursă de plasmă adsorbită*	*Sursă de ser*	*Timpul de coagulare în secunde după o incubație de:* 1′	2′	3′	4′	5′	6′	*Observații*
Normal	Normal	Normal	Normal	80″	65″	30″	15″	9″	11″	
Hemofilic A (Deficit de factor VIII)	Normal	Bolnav	Normal	90″	80″	76″	68″	60″	52″	Se corectează cu plasmă normală
		Normal	Bolnav	40″	17″	12″	9″	9″	9″	
Hemofilic B (Deficit de factor IX)	Normal	Normal	Bolnav	85″	65″	52″	46″	40″	36″	Se corectează cu ser normal
		Bolnav	Normal	70″	50″	30″	15″	12″	10″	
Hemofilic C (Deficit de factor XI) mai rar deficit de factor XII	Normal	Bolnav	Bolnav	80″	70″	60″	46″	35″	30″	Anomalia este evidentă doar cînd este prezentă atît plasma cît și serul de la bolnav.
		Normal	Bolnav	76″	65″	50″	30″	27″	27″	
		Bolnav	Normal	75″	60″	40″	26″	13″		
Deficit de factor X	Normal	Bolnav	Normal	70″	55″	30″	15″	12″	11″	Timpul de protrombină anormal.
		Normal	Bolnav	76″	66″	54″	44″	30″	30″	

* Testul de generare a tromboplastinei se efectuează doar după ce ne-am convins că nu este vorba de un deficit grav de fibrinogen, de un deficit de protrombină sau de prezența unor anticoagulanți (timpul de trombină normal).

Scanned with OKEN Scanner

9.14. Determinarea fibrinogenului

9.14.1. METODA RAPIDĂ SCHULTZ

Un *ml* plasmă citratată se pipetează într-un tub Nissel (tub de centrifugă efilat la porţiunea inferioară şi gradat) şi se încălzeşte timp de 10 minute pe baie la 56°C pentru denaturarea şi precipitarea fibrinogenului. Se centrifughează apoi 10 minute la 3000 turaţii pe minut şi se citeşte cantitatea de fibrinogen precipitat prin căldură pe gradaţiile tubului.

Valori normale: 0,04—0,07 *ml* precipitat.

Această metodă are doar o valoare orientativă şi este inutil de a se încerca transformarea valorilor citite pe tubul Nissel în *mg*% fibrinogen.

9.14.2. METODA COLORIMETRICĂ (RATNOFF ŞI MENZIE MODIFICATĂ DE ASTRUP ŞI COLAB.)

Principiu. Se bazează pe reacţia de culoare dată de aminoacizii aromatici din structura fibrinogenului cu reactivul fenolic Folin—Ciocîlteu.

Reactivi. 1) Soluţie NaCl 0,85%. *2*) $CaCl_2$ 0,025 *M*. *3*) Hidroxid de sodiu 2,5 *N* (10%). 4) HCl 1 *N*; *4*) Carbonat de sodiu 20%. *5*) Reactiv Folin Ciocîlteu (vezi pag. 115). Înainte de determinare se diluează 1 parte din soluţia mamă 2 *N* cu 9 părţi apă distilată. *6*) Standard de L-tirozină (se dizolvă 200 *mg* L-tirozină în 1000 *ml* HCl 0,05 *N*. Se păstrează la +4°C. *7*) Soluţia diluantă (se amestecă 10 *ml* NaOH 2,5 *N* cu 20 *ml* HCl 1 *N* şi se aduce la volumul de 100 *ml* cu apă distilată).

Procedeu. Din plasma citratată se iau 0,5 *ml* şi se trec într-o eprubetă care conţine 1 *ml* soluţie NaCl 0,85%. Se recalcifică cu 0,5 *ml* $CaCl_2$ 0,025 *M*. Se amestecă cu o baghetă de sticlă avînd porţiunea inferioară mai rugoasă; se lasă bagheta în amestec. După aproximativ 5 minute de la începutul coagulării bagheta este răsucită încet pentru a desprinde cheagul de pe pereţii eprubetei. Fibrina este apoi înfăşurată cu grijă pe baghetă lăsîndu-se în continuare în eprubetă. După o oră se termină înfăşurarea fibrinei pe baghetă iar lichidul este stors cu grijă din reţeaua de fibrină prin presare uşoară pe pereţii eprubetei. Cheagul se spală prin imersarea baghetei pe timp de 10 minute în soluţie NaCl 0,85%. Se scoate bagheta din acest lichid de spălare, se îndepărtează excesul de lichid cu o hîrtie de filtru şi se plasează apoi bagheta cu cheagul într-o eprubetă care conţine 1 *ml* NaOH 2,5 *N* avîndu-se grijă ca reţeaua de fibrină să fie complect imersată. Fibrina se dizolvă şi se hidrolizează prin plasarea eprubetei pe timp de 10 mi-

Scanned with OKEN Scanner

nute într-o baie de apă care fierbe. Se adaugă apoi 2 *ml* HCl 1 *N*. Se scoate acum bagheta din soluţie, spălîndu-se cu apă distilată, şi se aduce volumul lichidului din eprubetă la 10 *ml* cu apă distilată. (Se folosesc eprubete gradate). După amestecare se transferă 2,5 *ml* într-o altă eprubetă, la care se adaugă 1,5 *ml* Na_2CO_3 20% şi 2,5 *ml* din reactivul Folin—Ciocîlteu diluat. Se lasă 30 *min.* la temperatura camerei pentru dezvoltarea reacţiei de culoare şi se citeşte extincţia la 710 *nm* în cuva de 10 *mm* faţă de o probă în alb preparată fără cheag de fibrină. Probele care dau o extincţie mai mare de 0,55 se diluează. Diluarea hidrolizatului de fibrină se va face cu soluţie diluantă (7) iar apoi la 2,5 *ml* din hidrolizatul astfel diluat se adaugă carbonatul şi reactivul Folin—Ciocîlteu. Bineînţeles la calcul se va ţine cont de diluţie. Extincţiile citite se transformă în tirozină prin interpolare la o curbă de referinţă.

Trasarea curbei de tirozină. În 6 eprubete se adaugă cîte 7 *ml* apă distilată. În aceste eprubete se substituie 0 (proba în alb), 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 şi respectiv 1 *ml* de apă cu volumele respective din soluţia standard de tirozină (6). Se adaugă apoi 1 *ml* NaOH 2,5 *N* şi 2 *ml* HCl 1 *N* în fiecare eprubetă. Se transferă apoi 2,5 *ml* din fiecare diluţie de tirozină în cîte o eprubetă la care se adaugă 1,5 *ml* carbonat şi 2,5 *ml* reactiv Folin Ciocîlteu, diluat. După 30 de minute se citesc extincţiile în condiţiile arătate mai sus faţă de proba în alb. Se trec pe abscisă cantităţile de tirozină (corespunzînd la 0,04, 0,08, 0,12, 0,16 şi 0,20 *mg* tirozină) iar pe ordonată valorile corespunzătoare ale extincţiilor. Curba va trebui să treacă prin intersecţia celor două axe.

Pentru transformarea tirozinei găsite într-o probă de analizat în *mg* fibrinogen/100 *ml* plasmă se înmulţeşte cantitatea de tirozină (în *mg*) cu un factor de conversiune de 11,7 (calculat în funcţie de conţinutul în tirozină al fibrinogenului) şi se ia în considerare faptul că s-au luat în lucru 0,5 *ml* plasmă.

Astfel *mg* fibrinogen/100 *ml* = *mg* tirozină (din curbă) $\times$ 2 $\times$ 11,7 $\times$ 100.

Valorile normale sînt între 200—350 *mg*/100 *ml*. Fibrinogenemia scade în primele ore ale unui sindrom de coagulare intravasculară cu defibrinare (avort septic, embolie cu lichid amniotic etc.). Valorile mult scăzute sau nule întîlnesc în hipofibrinogenemii sau afibrinogenemii cu caracter familial. Creşterea fibrinogenemiei se întîlneşte în inflamaţii acute şi cronice, neoplasme şi după distrucţii tisulare (de exemplu postoperator sau după un infarct miocardic). Creşterea fibrinogeniei se însoţeşte de regulă de o creştere α_2 globulinelor şi de o accelerare a VSH.

Observaţii. Modificările aduse de Astrup şi colab. şi în special neutralizarea excesului de alcalii prin adaosul de HCl 1 *N*, creşte sensibilitatea reacţiei şi permite aprecierea unor valori de fibrinogen de

Scanned with OKEN Scanner

pînă la 9 *mg*/100 *ml*, iar rezultatele sînt mai constante decît în cazul altor variante de dozare a fibrinogenului pe baza conţinutului în tirozină.

Formarea cheagului poate fi accelerată prin adăugarea de 0,1 *ml* soluţie de trombină conţinînd 25 *u* NIH/*ml* (vezi pag. 357). În astfel de condiţii, cei 0,5 *ml* plasmă de analizat se pot dilua cu 5 *ml* NaCl 0,85% obţinîndu-se astfel o reţea de fibrină mai laxă care poate fi spălată mai uşor. Spălarea se poate efectua trecîndu-se cheagul intact pe o hîrtie de filtru umectată într-o pîlnioară şi turnîndu-se peste cheag lichid de spălare (NaCl 0,85%) de repetate ori. Reţeaua de fibrină spălată se trece apoi într-o eprubetă conţinînd 1 *ml* NaOH 2,5 *N* cu ajutorul unei baghete fără a mai fi însă înfăşurată pe baghetă. Se evită astfel manopera de spălare a baghetei şi nu mai este nevoie de eprubete gradate.

După experienţa noastră etalonarea se poate efectua mai exact cu ajutorul unei curbe de referinţă obţinută cu ajutorul fibrinogenului uman sau bovin.

Din fibrinogenul cîntărit la balanţa analitică se prepară prin dizolvare în NaOH 2,5 *N*, soluţii cu concentraţii cunoscute de 10 *mg*/*ml* (1000 *mg*/100 *ml*), 5 *mg*/*ml* 2,5 *mg*/*ml* şi 1,25 *mg*/*ml*. Cîte un *ml* din aceste soluţii se fierbe, efectuîndu-se apoi reacţia de culoare.

În cazul probei de analizat se va ţine cont că s-a pornit de la 0,5 *ml* plasmă. În consecinţă valorile obţinute prin interpolarea extincţiei la curba etalon de fibrinogen se vor înmulţi cu 2.

BIBLIOGRAFIE

Ratnoff, O. D., Menzie, C., J. Lab. Clin. Med., 1951, 37, 316. Astrup, T., Brakman, P., Nissen, U., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1965, 17, 57.

9.15. | Retracţia cheagului

Explorează în primul rînd funcţia plăcuţelor sanguine. Metoda volumetrică se bazează pe măsurarea volumelor de ser exprimat din cheag în cursul retracţiei.

Procedeu. 5 *ml* sînge nativ se aşază într-o eprubetă gradată. Înainte de coagularea sîngelui eprubeta se astupă cu un dop de cauciuc, prin care pătrunde o sîrmă. Eprubeta se introduce în baia termostată la 37°C timp de o oră după care se scoate dopul şi împreună cu el cheagul fixat de sîrmă. Se pot efectua mai multe probe testîndu-se retracţia la 1 oră, 4 ore şi 24 de ore. Serul rămas, şi conţinînd hematii

desprinse din cheag, se centrifughează. Volumul serului exprimat = volumul lichidului rămas după extracţia cheagului — volumul hematiilor sedimentate (VE). Volumul cheagului va fi = volumul total al sîngelui aşezat în eprubetă — volumul lichidului rămas după extracţia cheagului.

Rezultatele pot fi prezentate ca ser exprimat în procente din volumul total al sîngelui luat în experienţă. În mod normal după 4 ore serul exprimat reprezintă 30—50% din volumul total al sîngelui. Întrucît retracţia depinde de hematocrit s-au încercat diferite formule care să ţină cont de acest factor. Mihaela Papilian recomandă următoarea formulă pentru calculul indicelui de retracţie.

$$IR = \frac{34 - VE_X + \frac{\text{hematocrit}}{2}}{\text{volumul cheagului aflat}}.$$

În mod normal IR variază între 0,9 şi 1,1. Cifrele mai mari denotă o hiperretracţie, iar cifrele mai mici un deficit al procesului de retracţie. Astfel de deficite se găsesc în primul rînd în trombocitopenii şi trombastenii, dar şi în caz de hiperfibrinogenemii sau în prezenţa de inhibitori ai coagulării.

9.16. | Timpul de liză al euglobulinelor

Acest test care orientează asupra stării sistemului fibrinolitic se bazează pe faptul că o parte a fibrinogenului, activatorii plasmatici şi proenzima fibrinolitică (plasminogenul) precipită cu euglobulinele în timp ce o bună parte a inhibitorilor fibrinolizei rămîne în supernatant. Euglobulinele precipitate sînt dizolvate şi coagulate cu trombină, notîndu-se timpul de liză al cheagului.

După procedeul lui Von Kaulla modificat în laboratorul nostru se ia, un *ml* plasmă citratată care se diluează într-un tub de centrifugă cu 20 *ml* apă bidistilată, răcită la +4°C. Se acidulează apoi cu 0,3 *ml* acid acetic 1% şi se ţine 20 de minute la +4°C, după care se centrifughează timp de 15 minute la 3000 turaţii pe minut. Se îndepărtează supernatantul şi se ţin cupele de centrifugă cu gura în jos, timp de cîteva minute, pentru a se scurge restul de supernatant. Se dizolvă apoi euglobulinele într-un *ml* tampon barbituric cu $pH = 7{,}6$ (vezi pag. 343). Se iau duplicate de cîte 0,3 *ml* şi se coagulează la 37°C cu cîte 0,1 *ml* soluţie trombină 30 *u* NIH/*ml*. Cheagul trebuie să se producă în decurs de cîteva secunde. Tuburile în care s-au produs cheagurile de euglobuline vor fi observate pînă la liza totală a cheagului avîndu-se grijă să nu se agite, deoarece desprinderea cheagului întîrzie procesul de liză.

Scanned with OKEN Scanner

Valori normale: 240—360 minute.

Timpul de liză depinde în primul rînd de cantitatea de activatori umorali ai fibrinolizei din sîngele pacientului. El este influenţat şi de cantitatea de fibrinogen şi de măsura în care fibrinogenul şi o parte din inhibitorii fibrinolizei precipită cu euglobulinele. Aşa de exemplu betalipiproteinele favorizează precipitarea fibrinogenului şi inhibitorilor fibrinolizei cu euglobulinele.

Accelerarea timpului de liză se întîlneşte în cursul stărilor de hiperfibrinoliză date de creşterea activatorilor, iar încetinirea este dată de factori multipli şi nespecifici. Din acest motiv un timp prelungit de liză al euglobulinelor nu ne orientează asupra mecanismului care a dus la insuficienţa sistemului fibrinolitic. Pentru interpretarea modificărilor fibrinolizei în condiţii patologice vezi tabelul 24. De notat că activatorul umoral al fibrinolizei este labil, astfel încît el scade în sîngele recoltat şi păstrat la temperatura camerei. Din acest motiv se recomandă ca sîngele recoltat să fie răcit imediat pe o baie de gheaţă iar centrifugarea sîngelui şi efectuarea testului să se facă cît mai curînd de la recoltare.

9.17. | Timpul de liză al cheagului de sînge diluat

Principiu. Se urmăreşte timpul de liză al unui cheag format prin coagularea cu trombină a sîngelui de analizat diluat de 10 ori cu tampon acetat.

Reactivi. 1) Tampon acetat 0,12 *M*, $pH = 7{,}4$; se dizolvă 16,3 g acetat de sodiu cristalizat ($NaCOOCH_3 \cdot 3H_2O$) în 800 *ml* apă şi se ajustează *pH*-ul la 7,4 cu acid acetic 2%. Se completează apoi volumul la 1000 *ml* cu apă distilată). *2*) Trombină. Se păstrează ca soluţie concentrată de 200 *u* NIH/*ml* în glicerol 50% la —20°C; se diluează înainte de utilizare de 8 ori cu tampon (25 *u* NIH/*ml*).

Tehnica. Sîngele recoltat printr-un ac de puncţie venoasă este lăsat să curgă într-o eprubetă de plastic răcită pe o baie cu gheaţă. Se pipetează fără întîrziere 0,2 *ml* sînge într-o eprubetă serologică (120×10 *mm*) conţinînd 1,7 *ml* tampon acetat răcit în aceeaşi baie de gheaţă; se adaugă 0,1 *ml* trombină, se amestecă şi se transferă pe o baie de apă la 37°C. Întregul procedeu de la recoltarea sîngelui şi pînă la adăugarea trombinei să nu depăşească 1 minut. (Prin acesta se evită denaturarea activatorului labil al fibrinolizei). După 5 minute de incubare se rotesc uşor eprubetele pentru desprinderea cheagului de pe pereţii eprubetei şi apoi se urmăreşte la intervale regulate de timp pînă cînd liza cheagului este completă. Timpul de liză este reprezentat de intervalul între adaosul de trombină şi dispariţia oricăror urme de

Scanned with OKEN Scanner

cheag. La normali acest timp este de 140—200 minute. Efortul fizic accelerează procesul de liză.

Interpretare. Viteza de liză este accelerată de activatorul umoral al fibrinolizei şi este încetinită de o creştere a fibrinogenemiei, a factorului stabilizator al fibrinei (factor XIII) sau a inhibitorilor activării plasminogenului.

Prelungirea timpului de liză se întîlneşte la aterosclerotici, la reumatici sau postoperator. Accelerarea fibrinolizei se observă la cirotici, în unele forme de leucemii, în cursul intervenţiilor chirurgicale pe prostată sau în cursul terapiei fibrinolitice, cu streptokinază.

BIBLIOGRAFIE

Gallimore, M. J., Tyler, H. M., Shaw, J. T. B., Thrombosis et Diathesis Haemorhagica, 1971, 26, 295.

9.18. | Determinarea rezistenţei la streptokinază

Principiu. Se urmăreşte diluţia minimă de streptokinază care mai produce în decurs de 10 minute la 37°C liza totală a cheagului de sînge citratat coagulat cu trombină.

Se efectuează în special pentru stabilirea dozei iniţiale de streptokinază în vederea terapiei trombolitice.

Reactivi. 1) Sînge citratat de analizat (un volum citrat 3,8% la 9 volume sînge). *2*) Streptokinază test (flacon de 5000 *u.i.*). *3*) Trombină test (flacon de 60 *u* NIH). *4*) Ser fiziologic. *5*) Apă distilată.

Tehnica. Se dizolvă trombina în 1 *ml* apă distilată (60 *u* NIH/*ml*). 0,5 *ml* din această soluţie se diluează în continuare cu 2,5 *ml* apă distilată ajungîndu-se la o diluţie de 10 *u/ml.*

Se dizolvă sterptokinaza din flacon în 2,5 *ml* ser fiziologic (2.000 *u.i/ml*). Se efectuează în continuare în eprubete diluţii progresive de streptokinază conţinînd respectiv 2.000, 1.000, 500 şi 200 *u.i./ml.*

Într-un alt şir de eprubete menţinute pe baie de apă la 37°C se adaugă 0,1 *ml* din diluţiile de streptokinază preparate anterior, 0,8 *ml* sînge citratat şi 0,1 *ml* trombină. Coagularea se produce imediat.

Se urmăreşte în continuare apariţia lizei cheagului. Timpul de liză va fi cu atît mai lung cu cît sîngele va conţine mai mulţi inhibitori ai streptokinazei. Se notează cea mai mică concentraţie de streptokinază la care liza cheagului s-a produs în timp de 10 minute. Se ţine cont de faptul că în condiţiile de testare, streptokinaza s-a diluat din nou de 10 ori conţinînd respectiv 200, 100, 50 şi 20 *u.i./ml* amestec.

Scanned with OKEN Scanner

Stabilirea dozei inițiale de streptokinază ce urmează să fie aplicată în tratamentul trombolitic se face înmulțind cantitatea minimă de streptokinază la care a mai avut loc liza în decurs de 10 minute cu 5.000 (5.000 = 5 litri de sînge) reprezentînd volumul sanguin.

BIBLIOGRAFIE

Thrombolytic Therapy with Streptase. Behringwerke A.G. Marburg — Lahn 1972.

9.19. Determinarea adezivității plachetare (după Wright cu unele modificări).

Principiul se bazează pe proprietatea plăcuțelor sanguine de a adera pe suprafețe neumectabile așa cum este sticla. În principiu se rotește plasma citratată bogată în plăcuțe sau sîngele citratat într-un flacon de sticlă așa încît să se realizeze un contact între plăcuțe și suprafața de sticlă. Se determină numărul de plăcuțe înainte și după rotire stabilindu-se procentul de plăcuțe adezive.

Materiale. Citrat 3,8%, pipete și eprubete siliconate, balon de sticlă nesiliconată, cu fund rotund (de exemplu un balon Kjeldahl de 50 *ml*), dispozitiv pentru rotire asigurînd 32 rotații pe minut.

Tehnica. Se recoltează sîngele cu o canulă de puncție venoasă lăsîndu-se să curgă 9 *ml* de sînge direct într-o eprubetă gradată siliconată, conținînd un *ml* citrat 3,8%. Se amestecă prin răsturnare eprubeta. În cazul că se lucrează cu sîngele integral citratat se ia cu o pipetă siliconată un *ml* din sîngele citratat și se trece în balonul de sticlă nesiliconată rotindu-e timp de 7 minute. În cazul plasmei bogate în trombocite (vezi obținerea la pag. 342) se rotește un *ml* plasmă timp de 20 minute. Sîngele citratat sau plasma bogată în trombocite se trece apoi din flaconul de sticlă nesiliconată într-un vas siliconat și se recoltează pentru numărătoare.

Numărătoarea plăcuțelor se face după Brecher și Cronkite

$$\% \text{ plăcuțe adezive} = \frac{\text{plăcuțe înainte de rotire} - \text{plăcuțe după rotire} \times 100}{\text{plăcuțe înainte de rotire}}.$$

Interpretare. Valorile normale sînt de 20—30%. Este bine ca fiecare laborator să-și verifice metoda pe material propriu. Creșterea adezivității se întîlnește în stările de trombofilie cum ar fi de exemplu ateroscleroza, obezitatea sau diabetul saharat al adultului.

Scăderea sub 10% se întîlnește în uremii, sindromul de coagulare intravasculară diseminată sau în trombasteniile cu caracter genetic cum ar fi boala lui von Willebrandt.

Scanned with OKEN Scanner

Observaţii. Există şi alte metode de apreciere a adezivităţii cum ar fi metoda Bobek şi Cepelak, bazată pe filtrarea sîngelui prin vată de sticlă sau metoda Hellem bazată pe trecerea sîngelui sau plasmei bogată în trombocite printr-o coloană de perle de sticlă. Rezultatele obţinute pot diferi în funcţie de metoda folosită. De aceea standardizarea metodelor de apreciere a adezivităţii plachetare constituie încă un deziderat.

Explorarea funcţiilor plăcuţelor sanguine implică şi aprecierea agregabilităţii acestora sub efectul ADP, trombinei, adrenalinei, colagenului şi a altor agenţi agreganţi. Determinarea agregabilităţii se face turbidimetric şi se bazează pe înregistrarea variaţiilor densităţii optice ale unei suspensii de plăcuţe sanguine (de exemplu plasma bogată în trombocite) menţinută la 37°C, agitată cu un dispozitiv electromagnetic şi expusă la diverşi stimuli. Evidenţierea şi măsurarea fenomenului de punere în libertate a constituenţilor plachetari din plăcuţele stimulate cu trombină sau colagen implică dozări de ADP, AMP, serotonină, histamină etc. şi necesită reactivi şi aparatură complexă.

Pentru activitatea de rutină în laboratorul clinic, explorarea adezivităţii plachetare este în general suficientă.

BIBLIOGRAFIE

Wright, H. p, I. Path. Bact. 1941 (53) 255. Bobel, Cepelak, I. Matejcek, Zbl. Gynäk (958, 80, 1664). Hellem, A. J., Odegaard, A. E., Skalhegg, B. A., Tromb. Diath. Haemorrh., 1963, 10, 61. Cucuianu, M., Mustard, J. F., Nishizawa, E., J. Clin. Lab. Med. 1971, 77, 958.

9.20. Trombelastograma (T.E.G.)

Principiu. Trombelastografia este o metodă care permite înregistrarea continuă a procesului de iniţiere a coagulării (r), a vitezei de formare a cheagului (k) şi a elasticităţii cheagului (am).

Înregistrarea trombelastografică se bazează pe modificarea calităţilor mecanice (elasticitate, consistenţă) ale sîngelui în cursul procesului de transformare a fibrinogenului în fibrină şi a procesului de stabilizare a acesteia sub acţiunea factorilor stabilizatori plasmatici şi plachetari.

Aşa cum se arată în fig. 49, trombelastrograful este alcătuit dintr-o cuvă termostată la 37°C, în care pătrunde un piston; între pereţii cuvei şi piston se aşază sîngele de analizat. Soclul metalic pe care este amplasată cuva se mişcă împreună cu aceasta rotatoriu şi alternativ în jurul axei sale verticale cu o amplitudine de 4°45′ şi o durată de 9 secunde. Pistonul este suspendat de un fir de torsiune pe care este fixată o oglindă. Lumina primită de la o sursă este reflectată

Scanned with OKEN Scanner

de această oglindă pe hîrtia fotografică a unui kimograf care se deplasează cu o viteză de 2 *mm/min.*

Atît timp cît sîngele din cuva trombelastografului este lichid mişcările cuvei nu se transmit pistonului, lumina nu este deviată iar pe hîrtia fotografică se înscrie o dreaptă.

Filamentele de fibrină care se formează în cursul coagulării fixează pereţii cuvei de piston astfel încît mişcările cuvei se transmit pistonului, respectiv oglinzii, care va devia raza luminoasă de o parte şi de alta a dreptei înscrise anterior. În felul acesta graficul care se obţine are două braţe realizînd o formă de diapazon. Cu cît va începe mai repede formarea de filamente de fibrină cu atît mai repede se vor produce mişcările de torsiune ale pistonului imersat în sînge. Cu cît cheagul de fibrină format este mai ferm cu atît aceste mişcări vor fi mai accentuate.

Aşa cum reiese din fig. 50, din analiza T.E.G. se pot calcula o serie de parametrii:

1. Timpul de reacţie (*r*) este timpul de la recalcificare pînă la iniţierea coagulării vizualizată prin îndepărtarea între ele a braţelor T.E.G. pe o distanţă de 1 *mm.*

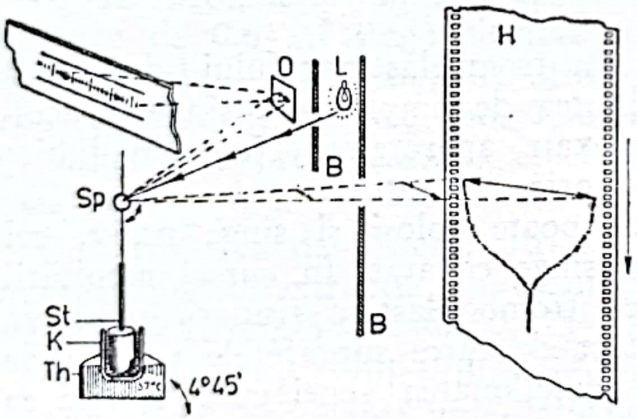


Fig. 49. Reprezentarea schematică a trombelastografului: Th, termostat, K, cuvetă, St, sistemul piston, O, oglindă, L, sursă de lumină, B, fantă, H, hîrtie fotografică.

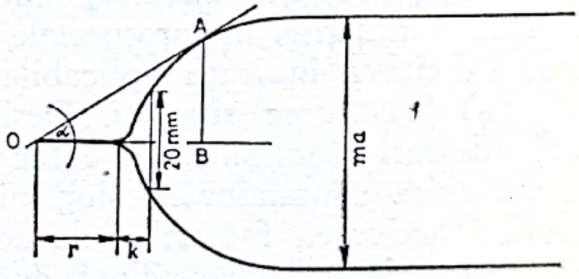


Fig. 50. Reprezentarea schematică a trombelastogramei. Semnificaţia indicilor r, k, şi a_m este descrisă în text. Tangenta dusă din punctul O (de pornire a determinării) la curba TEG formează cu prelungirea lui r şi k un unghi alfa, a cărui mărime depinde de coeficientul $\frac{AB}{OB}$ care este din punct de vedere trigonometric tangenta alfa. Indicele TEG = = tangentă alfa × 160 fiind de 65—75, la sîngele integral şi de 75—200, la sîngele citratat. Scăderea indicelui TEG denotă o predispoziţie la hemoragie iar creşterea lui denotă o tendinţă la tromboză.

Scanned with OKEN Scanner

Timpul de reacţie corespunde profazei coagulării şi începutului coagulării respectiv apariţiei de trombină.

2. *Timpul de formare a coagulului* (*k*) este intervalul cuprins între sfîrşitul perioadei *r* şi momentul în care depărtarea între braţele T.E.G. atinge 20 *mm*. În cazuri patologice cînd T.E.G. nu ajunge niciodată la o amplitudine de 20 *mm*, se poate utiliza o valoare *k* (10) corespunzătoare unei amplitudini de 10 *mm*. Timpul *k* nu reprezintă momentul încheierii procesului de coagulare ci este doar o măsură a vitezei cu care se formează un cheag de o anumită consistenţă. Întrucît viteza de deplasare a hîrtiei fotografice este de 2 *mm/min.*, valorile distanţei în *mm* se împart la 2 obţinîndu-se valorile *r* şi *k* în minute.

3. *Amplitudinea maximală* (*am*) reprezintă distanţa maximă între cele două braţe ale TEG. Pe baza valorii *am* se poate calcula aşa-zisa elasticitate maximă (ε) conform formulei:

$$\varepsilon = \frac{100 \times am}{100 - am}.$$

În timp ce „valorile longitudinale sau cronometrice" *r* şi *k* reprezintă timpi şi se exprimă în minute, *am* şi ε constituie aşa-zisele constante transversale (*am* se exprimă în *mm*) şi se referă la caracterele structurale ale cheagului.

Tehnica. Metodele de utilizare a trombelastrografului, descrierea aparatului, curăţirea cuvelor, modalitatea de umplere cu sînge a acestora sînt descrise în prospectele anexate aparatelor. Ne vom limita doar la cîteva indicaţii aplicabile la orice aparatură.

a) *Recoltarea sîngelui.* Deşi se poate folosi şi sînge nativ, cel mai adeseori determinările se fac pe sînge citratat. În cursul recoltării se va evita contaminarea sîngelui cu tromboplastină tisulară şi se va preveni activarea factorilor de contact de către suprafeţele umectabile cum este sticla. În consecinţă după puncţionarea venei cu o canulă se lasă să curgă primele picături de sînge, iar apoi se recoltează 9 *ml* sînge direct într-o eprubetă siliconată (sau de plastic) gradată la 10 *ml* şi conţinînd 1 *ml* citrat de sodiu 3,8% amestecîndu-se imediat prin înclinarea eprubetei. Recoltarea se poate face şi cu seringi de plastic evitîndu-se formarea de spumă. Nu se vor folosi seringi de sticlă.

În unele laboratoare se utilizează sîngele citratat în proporţie de 4 părţi sînge la 1 parte citrat 3,8%. O astfel de proporţie implică utilizarea unor concentraţii diferite de $CaCl_2$ şi se pot preta la confuzii. După experienţa noastră este mai recomandabilă utilizarea proporţiei uzuale de 9 părţi sînge la 1 parte citrat, un astfel de sînge putînd fi utilizat şi pentru alte determinări ale factorilor hemostazei.

b) *Efectuarea determinărilor.* Modul de lucru diferă în funcţie de utilizarea sîngelui nativ, respectiv a sîngelui sau plasmei citratate.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul utilizării *sîngelui nativ*, materialul proaspăt recoltat (0,36 *ml* sînge) se așază imediat în cuva trombelastografului încălzită în prealabil la 37°C, se coboară pistonul, se adaugă 1—2 picături de ulei de parafină (pentru a se preveni uscarea sîngelui în contact cu aerul) și se începe înregistrarea. Se notează cu ajutorul unui cronometru intervalul de timp de la recoltarea sîngelui și pînă la începerea înregistrării. Acest „timp de umplere" se adaugă la valoarea *r* înregistrată grafic.

În cazul utilizării *sîngelui citratat* este necesară o recalcifiere. Aceasta poate fi efectuată direct în cuva trombelastografului pipetîndu-se în cuva preîncălzită 0,3 *ml* sînge citratat și 0,1 *ml* $CaCl_2$ 0,0625 *M* (0,688%). Adaosul de $CaCl_2$ se va face de preferință cu o seringă de tuberculină iar vîrtejul produs de adăugarea acestei soluții este în măsură să producă un amestec satisfăcător al sîngelui cu soluția de $CaCl_2$. Se coboară apoi pistonul, se adaugă ulei de parafină și se începe înregistrarea. Recalcificarea se poate efectua și în afara cuvei trombelastografului producîndu-se amestecul de sînge citratat (3 părți) și $CaCl_2$ 0,0625 *M* (1 parte) într-o eprubetă siliconată sau de plastic, și trecîndu-se apoi 0,36 *ml* din amestec în cuva trombelastografului.

În prospectul aparatului Hellige se recomandă efectuarea unui amestec de 0,6 *ml* sînge citratat cu 0,4 *ml* $CaCl_2$ 0,025 *M* în NaCl 0,79% (soluție care poate fi utilizată și în alte determinări ale factorilor coagulării). Se trec apoi 0,36 *ml* din amestec în cuva trombelastografului și se procedează la efectuarea înregistrării așa cum s-a arătat mai sus.

Utilizarea de plasmă citratată nu prezintă avantaje față de utilizarea sîngelui citratat. (În cazul plasmei se vor utiliza volume egale de plasmă citratată și $CaCl_2$ 0,025 *M*).

Evident în cazul utilizării sîngelui sau plasmei citratate, „timpul de umplere" reprezintă intervalul de timp de la efectuarea recalcificării și pînă la începerea înregistrării grafice. Acest timp, măsurat cu ajutorul unui cronometru, se va adăuga la valoarea *r*, înregistrată grafic.

Valorile normale diferă după tehnica folosită. În cazul sîngelui nativ r = aprox. 12 *min.*, k = aprox. 8 *min.* iar *am* = 47—60 *mm.* (ε = 90—150).

În cazul sîngelui citratat recalcificat cu $CaCl_2$ 0,0625 *M*, r = aprox. 8 *min.*; k = aprox. 5 *min.* iar *am* = 47—53 *mm.* (ε=89—113).

Pentru sîngele citratat recalcificat cu $CaCl_2$ 0,025 *M*, r = aprox. 4 *min.*; k = aprox. 2 *min.* iar *am* va fi cu ceva mai scăzut din cauza unei diluări mai mari a sîngelui cu soluția de $CaCl_2$ (*am* = 43—50 *mm*; ε = 75—100).

Scanned with OKEN Scanner

Este însă recomandabil ca fiecare laborator să-şi stabilească valorile normale pe material propriu, efectuînd TEG cu tehnica aleasă la 10—20 persoane sănătoase. Rezultatele se pot da apoi în procente faţă de valorile medii ale normalului.

Modificări patologice ale TEG

În principiu TEG nu poate face o diferenţiere a diferitelor defecte de coagulare. Există însă unele indicii care permit o orientare în patologia coagulării (fig. 51 şi 52).

a) *Hemofilia* se traduce la TEG printr-o alungire marcată a constantei *r* şi *k* (mai ales *r*). La acelaşi aspect se poate ajunge prin tratament anticoagulant.

b) *Trombocitopeniile* sau defectele funcţionale ale plăcuţelor sanguine se evidenţiază în TEG prin îngustarea *am*. O scădere a *am* se întîlneşte şi în deficitul de factor stabilizator al fibrinei, sau în hipofibrinogenemii. Asocierea deficitelor plachetare şi plasmatice din cursul coagulopatiilor prin consum (coagularea intravasculară diseminată) apare deosebit de pregnant în TEG.

c) *Hipercoagularea* (starea de trombofilie) se poate decela în TEG atît printr-o scurtare a constantelor *r* şi *k* (hipercoagulare cronometrică) cît şi printr-o creştere a constantelor transversale (hipercoagulare de structură).

d) *Stările de hiperfibrinoliză*. Se însoţesc uneori de un aspect în formă de fus a TEG realizată prin apropiera celor două braţe pe măsură ce are loc procesul de liză al filamentelor de fibrină. Totodată prin produşi de liză ai fibrinei prezenţi în sînge apar modificări ale constantelor *r*, *k* şi *am*.

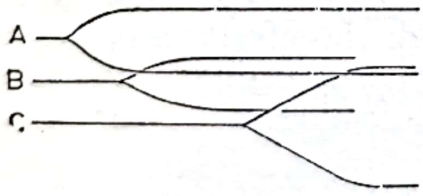


Fig. 51 — Modificări trombolastografice în unele diateze hemoragice. Curba A: r — normal, k — prelungit, a_m — diminuat (aspect întîlnit în trombocitopenie). Curba B: r şi k — prelungit, a_m — diminuat (aspect întîlnit în coagulopatia prin consum). Curba C: r şi k — prelungit, a_m — aproximativ normal (aspect întîlnit în hemofilie sau tratament cu anticoagulante).

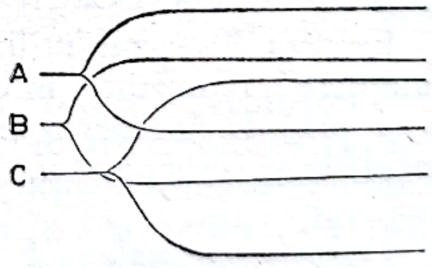


Fig. 52 Aspectul trombelastografic în trombofilie: A — aspect anormal; B — r şi; k — scurtat, a_m — bnormal; C — r şi k — uşor prelungit dar a_m mult lărgit

Scanned with OKEN Scanner

TEG nu constituie însă o metodă de elecţie pentru depistarea fibrinolizei patologice.

Erorile tehnice pot influenţa mult aspectul TEG şi pot duce la erori de interpretare. Astfel contaminarea sîngelui cu tromboplastină tisulară poate crea un aspect fals de hipercoagulare cronometrică şi structurală (scurtarea *r* şi *k* creşterea *am*). La acelaşi aspect se poate ajunge prin activarea factorilor de contact în urma manipulării sîngelui cu sticlărie nesiliconată.

Desprinderea cheagului de pe pereţii cuvei insuficient curăţită poate duce la false aspecte de fibrinoliză cu deosebirea că apropierea celor două braţe ale TEG nu se face uniform şi progresiv ca în fibrinoliză, ci în trepte.

BIBLIOGRAFIE

Jeanecke, J., *Antikoagulantien und Fibrinolysetherapie*, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1970. Hartert, H., Biorheology, 1962, 1, 31. Prospectul tromelastografului Hellige Model D.

9.21. | Analize speciale mai rar solicitate

Determinarea diferenţiată a factorilor sistemului coagulant şi a sistemului fibrinolitic.

În anumite situaţii particulare şi în special în scop de cercetare se fac determinări diferenţiate ale diverşilor factori implicaţi în coagulare, fibrinoliză sau în general în procesul de hemostază. Aceste determinări implică de regulă reactivi speciali, standardizaţi şi o oarecare experienţă în acest domeniu. Pentru informaţii suplimentare recomandăm monografia lui Perlik sau lucrările lui Johnson şi colaboratorii.

Am selectat însă cîteva tehnici mai accesibile laboratorului clinic care au o aplicabilitate mai largă în patologia clinică şi pe care le-am putut verifica în condiţiile noastre de lucru.

9.21.1. | DETERMINAREA FACTORULUI V (DUPĂ DESCRIEREA FĂCUTĂ DE PERLICK)

Principiu. Se adaugă diluţii ale plasmei de analizat la plasma normală învechită care are un conţinut practic nul de factor V şi se determină timpul de coagulare în prezenţă de tromboplastină şi de $CaCl_2$.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi. *1*) Oxalat de sodiu 0,1 *mol.* *2*) Tromboplastină. *3*) $CaCl_2$ 0,025 *mol.* *4*) Tampon medinal-acetat. *5*) Plasmă oxalatată învechită.

Reactivii au fost descrişi anterior (vezi pag. 342).

Tehnica. Plasma oxalatată de analizat, proaspăt obţinută se diluează 1/10 cu tampon. Se determină apoi timpul de coagulare la 37°C din amestecul: 0,1 *ml* plasmă proaspătă de analizat diluată +0,1 *ml* plasmă oxalatată învechită +0,1 *ml* soluţie tromboplastină +0,1 *ml* $CaCl_2$, (vezi pag. 349).

Evaluarea rezultatelor se face dintr-o curbă de calibrare preparată cu o plasmă proaspătă normală, diluată iniţial 1/10, din care se fac apoi în continuare diluţii de la 90% la 10%. Cu fiecare din diluţiile de plasmă normală se determină apoi timpul de coagulare în amestecul arătat mai sus. Pentru stabilirea curbei se trec pe abscisă diluţiile iar pe ordonată timpii obţinuţi. (Este preferabilă exprimarea dublu logaritmică, vezi pag. 349).

Timpul de coagulare în amestecul conţinînd plasma de analizat a pacienţilor se interpolează la valorile din curbă, iar rezultatele se exprimă în procente faţă de normal.

BIBLIOGRAFIE

Perlick, E., *Ger innungslaboratorium in Klinik und Praxis*, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1960. Johnson, A. J., McCarthy, W. R., Tillet, W. S., Tse, A. O., Skoza, L., Newman, J. and Sema, M., *Blood Coagulation, Hemorrhage and Thrombosis*, Ed. Grune & Straton, 1964.

9.21.2. DETERMINAREA FACTORULUI VII (DUPĂ KOLLER, LOELIGER ŞI DUCKERT)

Principiu. Se adaugă diluţii ale plasmei de analizat la o plasmă lipsită de factor VII şi se determină timpul de coagulare în prezenţa de tromboplastină şi $CaCl_2$.

Reactivi. *1*) Oxalat de sodiu 0,1 *mol.* *2*) Tromboplastină. *3*) Soluţie $CaCl_2$ 0,025 *mol.* *4*) Tampon acetat-medinal. *5*) Plasmă lipsită de factor VII (filtrată prin filtre de asbest) (vezi pag. 344).

Tehnica. Plasma oxalatată de analizat, proaspăt obţinută, se diluează 1/10 cu tampon. Se determină apoi timpul de coagulare la 37°C din amestecul: 0,1 *ml* plasmă de analizat, proaspătă diluată, +0,1 *ml* plasmă lipsită de factor VII + 0,1 tromboplastină + 0,1 $CaCl_2$.

Rezultatele se dau în procente faţă de normal şi se obţin dintr-o curbă de calibrare preparată cu diluţii ale unei plasme normale, obţinute în acelaşi mod ca şi în cazul determinării factorului V.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Koller, F., Loeliger, A. und Duckert, F., Acta haemat., 1951, 6, 1.

9.21.3. | DETERMINAREA FACTORULUI VIII

Aprecierea factorului VIII se face pornind de la principiul testului de generare al tromboplastinei (vezi pag. 351) sau urmărind efectul de corectare a deficitului de coagulare al unei plasme provenind de la bolnavi cu hemofilie.

La plasma deficitară se adaugă diluţii variate ale plasmei de analizat urmărindu-se în ce măsură se restabileşte capacitatea de generare a tromboplastinei.

Dat fiindcă hemofilia A dă cele mai grave forme de boală dăm mai jos o metodă relativ simplă pentru aprecierea semicantitativă a factorului VIII după Hardisty şi MacPherson.

Reactivi. *1*) Plasmă citratată normală. *2*) Plasmă citratată de analizat. *3*) Plasmă citratată de la un pacient cu hemofilie gravă (se poate păstra în porţiuni de cîte un *ml* îngheţată la 20°C în tuburi de plastic, topindu-se imediat înainte de întrebuinţare. *4*) Tampon barbituric *pH* 7,35, conţinînd 0,15% citrat de sodiu. *5*) Caolin (B.D.H.) sau alt preparat de caolină uşoară, 5 *mg/ml* suspensie în ser fiziologic. *6*) Sursa de fosfolipide, putîndu-se folosi în acest scop a) un extract de fosfolipide din fasole soia (de exemplu inosithin) 0,2 *mg/ml* sau *b*) extract cloroformic de creier sau *c*) extract trombocitar (vezi pag. 344—345). *7*) Soluţie $CaCl_2$ 0,025 *M*.

Tehnica. Înainte de efectuarea anlizei, plasma de analizat şi plasma normală se diluează 1/10 cu tampon. Se amestecă apoi 0,1 *ml* sursă de fosfolipide cu 0,1 *ml* plasmă nediluată provenită de la un bolnav cu hemofilie severă 0,1 *ml* plasmă de analizat diluată şi 0,1 *ml* suspensie de caolin. Se porneşte un cronometru în momentul adăugării caolinei şi după 10 minute se adaugă 0,1 *ml* $CaCl_2$, pornindu-se un al doilea cronometru. Se notează timpul de coagulare.

Valoarea obţinută se interpolează la o curbă de calibrare, preparată cu diluţii de plasmă normală folosite în acelaşi sistem de testare, în locul plasmei de analizat. Rezultatul se exprimă în procente faţă de normal.

Observaţii. Caolinul are rolul de a activa pe deplin factorii de contact şi de a scurta timpul de coagulare dînd totodată rezultate mai reproductibile. El nu este însă un reactiv strict necesar.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Egeberg, P., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1961, 13, 140. Egli, H., Schneider, W., Thrombosis et Diathesis Hem., 1962, 7, 523. Hardisty, R. M., MacPherson Janet, C. Thrombosis et Diat. Hem., 1962, 7, 215.

9.21.4. | DETERMINAREA FACTORULUI IX (SERIC)

Se poate efectua în sistemul 0,1 *ml* ser de analizat diluat 1/10 cu tampon barbituric + 0,1 *ml* plasmă de hemofilic B + 0,1 *ml* extract cloroformic de creier (vezi pag. 345) sau altă sursă de fosfolipide. După o incubare de 30 secunde se adaugă 0,1 *ml* $CaCl_2$ 0,025 *M* şi se măsoară timpul de coagulare. Rezultatul se exprimă în procente faţă de normal, folosindu-se o curbă de calibrare preparată cu diluţii de ser normal. Ca şi în cazul factorilor V, VII, VIII, diluţia iniţială de 1/10 este considerată ca 100%. Recent s-a încercat o standardizare a metodelor de dozare a factorului IX recomandîndu-se activarea sistemului cu caolin sau celită.

BIBLIOGRAFIE

D. L. Aronson în Thrombosis: Risk Factors and Diagnostic Approaches F. K. Schattaner Stuttgart—New York 1971, p. 307.

Observaţii. În lipsă de plasmă de hemofilic, se poate aplica metoda în doi timpi, bazată pe generarea de tromboplastină intrinsecă după principiul lui Biggs şi MacFarlana (vezi pag. 351).

Redăm mai jos o metodă de evaluare aproximativă a factorului VIII şi IX. după descrierea făcută de Perlick.

Reactivi. 1) Plasmă citratată de bolnav adsorbită pe $BaSO_4$. *2*) Plasmă citratată normală, adsorbită pe $BaSO_4$. Plasmele adsorbite după procedeul arătat la pag. 343 se pot păstra timp de 24 ore la +4°C. Înainte de utilizare se diluează 1/10 şi 1/25 cu tampon barbituric. *3*) Ser de bolnav. *4*) Ser normal. Este bine ca sîngele să stea 24 *h* la 37°C pentru un consum cît mai complet al protrombinei. A doua zi se separă serurile şi se diluează 1/10 şi 1/25 cu acelaşi tampon. *5*) Suspensie de plăcuţe normale (vezi pag. 344). În locul suspensiei de plăcuţe se poate folosi extract cloroformic de creier ca sursă de fosfolipide (vezi pag. 345). *6*) Plasmă normală citratată, proaspăt recoltată şi centrifugată la 3500 r.p.m. timp de 15 minute. Această plasmă urmează a fi folosită ca substrat. *7*) $CaCl_2$ 0,025 *M*.

Tehnica. Dozarea factorului VIII. Se pipetează cîte 0,1 *ml* din plasma substrat (reactiv 6) într-o serie de eprubete care se aşază în

Scanned with OKEN Scanner

stativ, la 37°C. Se efectuează apoi într-o altă eprubetă un amestec conținînd: 0,5 *ml* plasmă de pacient, adsorbită pe sulfat de Ba și diluată 1/25, + 0,5 *ml* ser normal diluat 1/10 + 0,5 *ml* suspensie plachetară (respectiv sursa de fosfolipide) + 0,5 soluție $CaCl_2$. Se pornește un cronometru din momentul adăugării $CaCl_2$ și după 2 minute de incubare se pipetează 0,1 *ml* din amestec și se adaugă, împreună cu 0,1 *ml* $CaCl_2$, în una din eprubetele conținînd plasmă substrat, pornindu-se un al doilea cronometru. La intervale de cîte un minut se iau din nou cîte 0,1 *ml* amestec și 0,1 *ml* $CaCl_2$, testîndu-se efectul tromboplastinei endogene, generate în amestec, asupra plasmei substrat. Cel mai scurt timp de coagulare obținut în plasma substrat se consideră ca o măsură a cantității de factor VIII și se exprimă în procente față de normal. Pentru aceasta e nevoie să se pregătească o curbă de calibrare în care plasma normală (sau un amestec de plasme normale) adsorbită pe $BaSO_4$ și diluată 1/25 este considerată ca avînd un conținut 100% de factor VIII. Se realizează apoi diluții de la 90% la 10% ale acestei plasme și se efectuează cu fiecare din ele testul de generare, așa cum a fost descris mai sus.

Se trec pe abcisă diluțiile în procente a plasmei normale iar pe ordonată cei mai scurți timpi de coagulare obținuți cu fiecare din diluțiile realizate. Valorile în procente de activitate a factorului VIII în plasma de analizat se obțin prin interpolare în curbă.

Tehnica dozării factorului IX (seric). Ca și în cazul dozării factorului VIII se pipetează cîte 0,1 *ml* din plasma substrat (reactiv 6) într-o serie de eprubete care se așază în stativ la 37°C. Se realizează apoi într-o eprubetă amestecul de 0,5 *ml* plasmă normală adsorbită și diluată 1/10 + 0,5 *ml* ser de bolnav diluat 1/25 + 0,5 *ml* suspensie de trombocite (sau altă sursă de fosfolipide) + 0,5 *ml* $CaCl_2$ 0,025 *M*. Se procedează ca și în cazul dozării factorului VIII, iar cel mai scurt timp de coagulare obținut în plasma substrat reprezintă măsura activității factorului IX. Exprimarea se face în procente pe baza unei curbe de calibrare în care serul normal (sau mai bine un amestec de seruri normale) diluat 1/25 este considerat ca avînd un conținut de 100% factor IX.

BIBLIOGRAFIE

Perlick, E., *Gerrinnugslaboratorium in Klinik und Praxis*, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1960.

9.21.5. | DETERMINAREA FACTORULUI X

Deficitul de factor X produce perturbări atît în sistemul coagulant intrinsec cît și în cel extrinsec, caracterizate atît printr-o alterare în mecanismul de generare al tromboplastinei (așa cum se constată

Scanned with OKEN Scanner

în hemofilii) cît şi printr-o prelungire a timpului de protrombină (Quick) determinat cu tromboplastină din creier (aşa cum se constată în deficitul de factori II, V sau VII). Se constată totodată o prelungire a timpului Howell şi un deficit în consumul de protrombină. Caracteristică pentru deficitul de factor X este însă modificarea testului Stypven (cu venin de viperă Russeli).

Testul cu venin de vipera Russeli

Se amestecă la 37°C 0,1 *ml* plasmă oxalatată de analizat +0,1 *ml* tampon barbituric + 0,1 *ml* venin de viperă diluat 1/40.000 în tampon barbituric + 0,1 *ml* suspensie de lecitină 20 *mg*%. După 30 secunde se adaugă 0,1 *ml* soluţie $CaCl_2$ 0,025 *M* şi se măsoară timpul pînă la apariţia primelor filamente de fibrină. Evaluarea rezultatelor se face cu ajutorul unei curbe de calibrare, preparată cu diluţii de plasmă normală.

BIBLIOGRAFIE

E. Parlick — ibid.

9.21.6. TEST PENTRU DEPISTAREA UNUI DEFICIT DE FACTOR XIII (FACTOR STABILIZATOR AL FIBRINEI)

Principiu. Sub acţiunea factorului XIII se creează legături transversale între monomerii de fibrină, astfel încît fibrina stabilizată devine insolubilă faţă de acţiunea litică a soluţiilor de uree 5 *M* sau de acid monocloracetic 1%. În deficitul grav de factor XIII, reactivii menţionaţi vor produce liza cheagului.

Reactivi. *1*) Plasmă citratată normală. *2*) Plasmă citratată de analizat. *3*) Tampon tris 0,2 *M* $pH = 7{,}4$. *4*) $CaCl_2$ 0,025 *M*. *5*) Uree 5 *M* în tampon tris. *6*) Acid monocloracetic 1% în tampon Tris.

Tehnica. Se diluează atît plasma normală cît şi cea de analizat adăugîndu-se 0,3 *ml* tampon tris la 0,6 *ml* plasmă.

Se pipetează cîte 0,3 *ml* plasmă diluată de analizat în 2 eprubete şi cîte 0,3 *ml* plasmă diluată normală în alte 2 eprubete. În toate cele 4 eprubete se adaugă 0,2 *ml* $CaCl_2$ 0,025 *M* şi se incubează 30 minute la 37°C. Se adaugă cîte 3 *ml* uree 5 *M* la un cheag normal şi la un cheag de analizat şi cîte 3 *ml* acid monocloracetic la celelalte 2 eprubete conţinînd cîte un cheag. Se agită şi se lasă la temperatura camerei timp de 24 de ore.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultate. Dacă factorul XIII este absent sau foarte mult scăzut (de regulă deficit genetic) cheagul din plasma de analizat va fi complet lizat în ambele eprubete; cheagurile provenite din plasma normală vor fi neafectate.

BIBLIOGRAFIE

Lynch, M. I., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., Inwood, M.I.H., *Medical laboratory technology and clinical pathology*, Ed. N. B. Saunders, Philadelphia—London—Toronto, 1969.

9.21.7. | TESTAREA SEMICANTITATIVĂ A FACTORULUI XIII

Principiu. Se determină cea mai avansată diluţie a plasmei de analizat care mai este capabilă să stabilizeze un cheag format din 1 *mg* fibrinogen purificat, crescîndu-i rezistenţa faţă de acţiunea litică a acidului monocloracetic.

Reactivi. 1) Soluţie salină tamponată cu tampon imidazol $pH = 7,8$: tampon imidazol 0,05 *M* $pH = 7,8$ (1 parte) NaCl 0,9% (9 părţi). *2*) Soluţie cisteină 0,05 *M* în soluţie salină tamponată cu tampon imidazol. *3*) $CaCl_2$ 0,025 *M*. *4*) Trombină (Roche) 200 *u* NIH/*ml* în glicerină 50%. Se păstrează la —20°C. *5*) Soluţie trombină calciu, se prepară proaspăt înainte de utilizare: 10 *u.* NIH/*ml* în $CaCl_2$ 0,025 *M*. *6*) Soluţie acid monocloracetic 0,05 *M*. *7*) Substrat fibrinogen lipsit de factor de stabilizare obţinut prin purificarea fibrinogenului uman Kabi pe DEAE celuloză (vezi la observaţii). Se utilizează o soluţie de fibrinogen conţinînd 5 *mg/ml*.

Tehnica. Din sînge oxalatat (o parte oxalat de sodiu 1,34% + 9 părţi sînge) se separă plasmă oxalatată lipsită de trombocite prin centrifugare la 3500 r.p.m. timp de 30 *min*. Probele de analizat se pot păstra pînă la testare în tuburi de plastic la —20°C. Plasma normală obţinută de la 10 donatori este congelată în porţiuni de 1 *ml* (se păstrează la —20°C) şi utilizată în fiecare serie de determinări pentru a se verifica constanţa rezultatelor.

Pentru determinarea factorului XIII plasma este decongelată la 37°C şi se fac diluţii binare cu rata de 1/100 în soluţie salină tamponată. Pentru calcularea diluţiei finale se ţine cont că o diluţie de 1/5 se realizează în amestecul de reacţie. De exemplu, 50 microlitri plasmă în 10 *ml* soluţie salină tamponată realizează o diluţie iniţială de 1/200 ceea ce corespunde la o diluţie finală de 1/1000 în amestecul de reacţie.

Amestecul de reacţie conţine: 0,2 *ml* fibrinogen lipsit de factor XIII (5 *mg/ml*); 0,2 *ml* soluţie salină tamponată $pH = 7,8$; 0,2 *ml*

Scanned with OKEN Scanner

cisteină 0,05 *M* în tris *pH* = 7,8; 0,2 *ml* diluţie de plasmă; 0,2 *ml* soluţie trombină în calciu (10 *U* NIH/*ml* în $CaCl_2$ 0,025 *M*).

Cheagul cu un volum de 1 *ml* obţinut în acest amestec şi conţinînd 1 *mg* fibrină este incubat în baie de apă la 37°C, timp de 60 *min.*, după care este testată solubilitatea lui în 2 *ml* acid monocloracetic 0,05 *M*. Cheagul nestabilizat este solvit în mai puţin de 60 secunde.

Interpretare. Definirea unităţii arbitrare de factor XIII. Conţinutul plasmei în factor XIII exprimat în unităţi arbitrare corespunde la reciproca diluţiei celei mai mari a plasmei testate care produce stabilizarea cheagului de fibrină (cheagul rezistă la acţiunea dizolvantă a acidului monocloracetic cel puţin 60 de secunde). La normali această valoare este de 1000—1200 unităţi. Factorul XIII scade mult în deficitul familial. Scăderi se constată şi în insuficienţa hepatică (deficit de sinteză) precum şi în sindroamele de coagulare intravasculară diseminată (consum în exces). Creşteri ale factorului XIII s-au constatat la aterosclerotici şi hiperlipemici.

Observaţii. Metoda este reproductibilă şi nu depinde de conţinutul în fibrinogen al plasmei de analizat. Este însă foarte important să se asigure o concentraţie constantă a fibrinogenului substrat.

În locul tamponului de imidazol se poate folosi tampon tris 0,05 *M* în NaCl 0,9% la *pH* = 7,8. Cisteina se poate dizolva în tampon tris aşa încît să se obţină o concentraţie de cisteină 0,05 *M* şi un *pH* de 7,8 (se dizolvă 0,2 *g* cisteină hidroclorică în 10 *ml* apă distilată şi 0,4 *g* tris în 10 *ml* apă distilată. Se amestecă cele două soluţii şi se ajustează *pH*-ul la 7,8. Se completează cu apă distilată la volum de 25 *ml*.

Purificarea fibrinogenului. Se poate obţine în laborator cu ajutorul unei modificări a metodei lui Mosesson şi Finlayson prin cromatografie pe DEAE celuloză.

Reactivi. 1) DEAE celuloză. *2*) Tampon A (tris 0,039 *M* + H_3PO_4 0,005 *M*, *pH* = 8,6). *3*) Tampon B (tris 0,5 *M* + H_3PO_4 0,5 *M*, *pH* = 24,1). *4*) Tampon C (81 volume tampon B + 919 volume tampon A, *pH* = 6,8—7,0. *5*) Coloana pentru cromatografie 3,4/25 *cm*.

Se pot folosi şi coloane cu alte dimensiuni cu condiţia ca volumul coloanei să fie apropiat de volumul acestei coloane. Pe o astfel de coloană poate fi purificată o cantitate de 2 g fibrinogen în cursul unui experiment.

Pregătirea coloanei. Pulbere de DEAE celuloză (20—30 g) se suspendă în apă distilată şi se lasă să se sedimenteze. Particulele fine care nu sedimentează se îndepărtează. Operaţia se repetă de 2—3 ori.

Scanned with OKEN Scanner

DEAE celuloza se transferă într-o pîlnie filtrantă. Se spală celuloza cu CH_3COOH 0,5 *N* (sau H_3PO_4 0,5 *N*) şi apă distilată pînă la îndepărtarea acidului. Se spală apoi cu NaOH 0,5 *M* şi din nou cu apă distilată pînă la îndepărtarea urmelor de NaOH. Operaţia se repetă de 2—3 ori.

Se suspendă celuloza în 1000 *ml* Tampon A, se agită 1 *h*, se lasă să sedimenteze 30′. Supernatantul se decantează. Operaţia se repetă de 3 ori, după care celuloza se încarcă pe coloană şi se spală cu Tampon A (debit 40 *ml/h*), pînă cînd lichidul efluent are *pH* = 8,5.

Prepararea fibrinogenului pentru cromatografie. Fibrinogenul uman Kabi (sau de altă proveniență) se solvă în Tampon A (concentraţia fibrinogenului 1%). Se dializează faţă de acelaşi tampon (de 10—20 ori volumul soluţiei dializate) schimbînd tamponul de 3 ori în timp de 24 ore.

Cromatografierea fibrinogenului pentru obţinerea fibrinogenului lipsit de FSF. Fibrinogenul se adsoarbe pe coloana de DEAE celuloză. Se spală coloana de proteinele neadsorbite cu 500 *ml* Tampon A. Fibrinogenul lipsit de factorul XIII se eluează cu Tamponul C. Debitul de eluţie este 40—60 *ml/h*. Se colectează fracţiuni de 10 *ml*. Se determină proteinele din fracţiunile colectate şi vîrful eluat se colectează. Soluţia de fibrinogen se concentrează prin dializă faţă de polivinilpirolidonă (PVP) 10—20%, concentratul se dializează faţă de cantităţi mari de Tampon tris 0,05 *M* *pH* = 7,8 în NaCl 0,9% (20 ori volumul concentratului). Se determină concentraţia fibrinogenului şi se ajustează la 5 *mg/ml* cu soluţie salină tamponată cu tris. Fracţiunea se înfiolează în porţiuni de 3 *ml*, se congelează în amestec zăpadă carbonică-acetonă şi se păstrează la —20°C.

Toate operaţiile pînă la congelare se fac la +4°C.

Regenerarea coloanei pentru o nouă cromatografiere se face prin spălare cu Tampon B.

Testarea calitativă a contaminării cu factor XIII a fibrinogenului substrat. Se face următorul amestec de reacţie, într-o eprubetă:

0,6 *ml* fibrinogen (2,5 *mg/ml* în soluţie salină tamponată; 0,2 *ml* cisteină 0,05 *M*; 0,2 *ml* soluţie trombină (10 *u* NIH/*ml* sol. $CaCl_2$ 0,025 *M*). Cheagul format se acoperă cu ulei de parafină şi se incubează 24 ore în baie de apă la 37°C. Cheagul necontaminat cu factor XIII se solvă în mai puţin de 60 secunde dacă se suspendă în acid monocloracetic 0,05 *M*.

Observaţii. În ultimii ani s-au elaborat metode mai precise bazate pe catalizarea de către factorul XIII a incorporării de dansyl-cadaverină în cazeină şi măsurarea fluorimetrică a compusului format (Sheltawy 1972).

Scanned with OKEN Scanner

Hcene D. L., Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, 1968, suppl. 28, p. 23. — Moesesson M. W., Finlayson I. J. Lab. Clin. Med. 1963, 62, 663. — Cucuianu M., Vasile V., Popescu T., Opincaru A., Crîsnic I., Tapalagă P. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, 1973, 30, 480. Sheltawy M. J., Miloszewski K., Losowsky M. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica 1972, 28, 483.

9.21.8. DETERMINAREA PLASMINOGENULUI
METODA CASEINOLITICĂ

Principiu. Se bazează pe aprecierea produşilor de hidroliză a caseinei rezultaţi în urma acţiunii proteolitice a plasminei produse prin activarea cu streptokinază a plasminogenului.

Reactivi: 1) Acid clorhidric 0,5 *N*, *2*) Hidroxid de sodiu 0,5 *N*. *3*) Tampon tris *pH* 7,5; 0,2 *M*. *4*) Caseină (Hammarsten) 8% proaspăt dizolvată în tampon tris. (Substrat pentru plasminogen). *5*) Caseină 4% în tampon tris (solvent pentru streptokinază). *6*) Streptokinază 500 *u/ml* proaspăt preparată prin dizolvare în soluţia de caseină 4%. *7*) Acid tricloracetic 10%.

Procedeu. Se obţine plasmă din sînge recoltat cu anticoagulant în vase siliconate. La 1 *ml* plasmă se adaugă 0,5 *ml* HCl 0,5 *N* şi se ţine la temperatura camerei timp de 15 minute pentru inactivarea inhibitorilor, după care se neutralizează cu 0,5 *ml* NaOH 0,5 *N*. Se adaugă apoi 1 *ml* din soluţia de streptokinază 500 *u/ml* şi se incubează pe baie la 37° timp de 10 minute. În continuare se adaugă 2 *ml* caseină, substrat 8%. După 2 minute şi respectiv după 32 de minute de la adăugarea caseinei se iau cîte 2 *ml* din amestec şi se precipită cu 2 *ml* acid tricloracetic 10%. După ce se lasă cîteva ore la frigider se centrifughează 20 minute la 3500 t.p.m. şi se dozează tirozina acidosolubilă din supernatant în cuve de cuarţ la 280 *nm*, cu ajutorul unui spectrofotometru. Cantitatea de tirozină din supernatant se apreciază pe baza unei curbe de calibrare preparată cu tirozină în concentraţii de 10, 20, 40, 60 µg/*ml*.

Rezultatele se exprimă în unităţi Remmert—Cohen. O astfel de unitate este definită ca fiind cantitatea de plasmină care eliberează 7,5 µg tirozină pe minut din soluţia de caseină.

Observaţii. În loc de a se produce inactivarea antiplasminei prin acidifiere se pot folosi euglobulinele preparate aşa cum s-a descris la pag. 356 şi care sînt în bună parte lipsite de inhibitori. În acest caz la un *ml* de euglobuline dizolvate în tampon tris se adaugă 1 *ml* din acelaşi tampon şi apoi se procedează în acelaşi mod ca şi în cazul plasmei: activare cu SK, adaos de substrat etc.

Scanned with OKEN Scanner

În lipsa unui spectrofotometru capabil să detecteze variații ale densității optice la 280 *nm*, se poate folosi o metodă fotocolorimetrică bazată pe reacția de culoare a tirozinei cu reactivul Folin-Ciocîlteu.

Pentru aceasta se ia 1 *ml* filtrat tricloracetic la care se adaugă 0,5 *ml* NaOH 10%, 5 *ml* apă distilată, 3 *ml* carbonat de sodiu 20% și 0,5 *ml* reactiv Folin-Ciocîlteu 1 N (vezi pag. 115). După o agitare puternică se dezvoltă o culoare albastră care după 20 minute se citește la fotometru la 650 *nm* față de o probă în alb preparată în același fel, dar conținînd apă în loc de filtrat tricloracetic. Valorile de tirozină pe 1 *ml* filtrat tricloracetic se obțin dintr-o curbă de tirozină, preparată așa cum s-a arătat mai sus.

Activitatea caseinolitică se exprimă în μg tirozină eliberată de un mililitru plasmă (euglobuline) pe timp de un minut, calculîndu-se, în funcție de diluțiile efectuate în cursul manoperei, după formula:

$$\mu g \text{ tirozină}/ml/\text{minut} = \frac{\text{concentrația tirozinei eliberată la } 32' - \text{concentrația tirozinei la } 2'}{3}.$$

Valorile normale sînt de 2,5—3,5 unități Remmert-Cohen, fiind cu ceva mai joase atunci cînd se folosesc euglobulinele.

Datorită dificultăților în standardizarea reactivilor este recomandabil ca fiecare laborator să-și stabilească valorile normale pe un număr de 10—15 subiecți clinic sănătoși.

BIBLIOGRAFIE

Spöttl, F., Constantini, R., Trombosis Diathesis Haemorrh. (Stuttg.). 1967, 18, 416.

9.21.9. DETERMINAREA INHIBITORILOR SERICI AI ACTIVĂRII PLASMINOGENULUI

Se bazează pe inhibarea de către serul de analizat a procesului de fibrinoliză activat de urokinază (sau de streptokinază).

Reactivi. 1) Tampon tris cu o molaritate de 0,2 și $pH = 7,4$. *2*) Fibrinogen bovin sau uman în soluție 5% proaspăt preparată prin dizolvarea în ser fiziologic. *3*) Trombină „Topostasine Roche", soluție proaspăt preparată conținînd 20 *u* NIH/*ml*; Streptokinază (Kabikinase sau Streptase); Urokinază-Leo conținînd 3.600 *u* Ploug/*mg* sau Calbiochem conținînd 2.400 *u* Ploug/fiolă; Plasminogen (De ex. Kabi, Stockholm).

Tehnica. Serul de analizat se diluează cu tampon tris: 1/1, 1/2, 1/8, 1/16, 1/32. Se dizolvă în tampon tris fibrinogenul, obținîndu-se

Scanned with OKEN Scanner

o soluţie de 0,5%. Urokinaza se dizolvă în apă distilată obţinîndu-se o soluţie de 180 *u* Ploug/*ml*. (În cazul streptokinazei se obţine o soluţie conţinînd 50 *u/ml* în ser fiziologic). Din plasminogen se face o soluţie conţinînd 0,1 *mg/ml* în ser fiziologic.

Se efectuează următorul amestec:

a) În cazul activării plasminogenului cu streptokinază: 0,5 *ml* ser de analizat în diluţii variate + 0,2 *ml* fibrinogen uman 0,5% + 0,1 *ml* streptokinază (50 *u/ml*) + 0,2 *ml* trombină (10 *u* NIH/*ml*).

b) În cazul activării cu urokinază: 0,5 *ml* ser de analizat în diluţii + 0,1 *ml* plasminogen (0,1 *mg/ml*) + 0,2 fibrinogen bovin 0,5% + 0,1 urokinază (180 *u* Ploug/*ml*) + 0,1 *ml* trombină (20 *u* NIH/*ml*).

Se măsoară timpul de liză din momentul în care s-a adăugat streptokinaza sau urokinaza. Trombina se adaugă dealtfel cît mai rapid posibil după streptokinază sau urokinază. Se inclină tuburile pentru a se amesteca conţinutul lor şi a se produce o coagulare uniformă. Se plasează amestecul coagulat pe baie de apă la 37°C şi se inclină tuburile la fiecare 1—2 minute pentru a se depista liza totală a cheagului.

Se pot folosi 2 probe de control din care în una se înlocuieşte serul de analizat cu 0,5 *ml* soluţie ClNa 0,9% iar în alta cu 0,5 *ml* soluţie acid ε-aminocaproic 0,1% în ser fiziologic. Această ultimă probă se foloseşte pentru a se verifica constanţa determinărilor efectuate cu diferite ocazii. Este bine să se folosească şi o probă martor alcătuită din 0,5 *ml* ser (în diluţii diferite) obţinut din amestecul a 10—20 seruri provenite de la subiecţi normali. Rezultatele se vor da în timp de liză sau în procente din valorile obţinute cu proba martor (ser-normal).

Observaţii şi interpretare. Nu se vor utiliza seruri prezentînd semne de hemoliză. Înainte de utilizare, serurile pot fi păstrate la +4°C dar nu mai mult de 24 ore. Serurile pot fi menţinute la —20°C timp de mai multe săptămîni dar trebuiesc utilizate în decurs de 20—60 minute de la desgheţare.

Inhibitorii activării plasminogenului scad în cirozele hepatice avansate şi cresc evident în reacţiile de fază acută (stări postoperatorii, infecţii acute, infarct miocardic etc.).

BIBLIOGRAFIE

Paraskevas, M., Nilsson, I. M., and Martinsson, G., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1962, 138—144.

Scanned with OKEN Scanner

9.22. Interpretarea testelor de coagulare. Diagnosticul sindroamelor hemoragice

În general testele de explorare a coagulării amintite mai sus sînt suficiente pentru diferenţierea sindroamelor hemoragice. Diagnosticul unui astfel de sindrom va porni în primul rînd de la:

A. Consideraţii teoretice, după care deficitul hemostazei este consecinţa unei insuficienţe sau a unei hiperactivităţi a următoarelor sisteme:

1. Vasele pot prezenta defecte congenitale sau pot prezenta leziuni în cursul scorbutului, a stărilor toxiinfecţioase, cînd se asociază de regulă cu o coagulopatie prin consum sau în cursul reacţiilor alergice.

2. Plăcuţele sanguine, pot scădea în cursul diferitelor boli ale măduvei osoase sau în trombocitopenia esenţială. Defectele funcţionale ale plăcuţelor constituie aşa-zisele trombastenii.

3. Coagularea sîngelui poate fi insuficientă în a) deficit congenital al factorilor coagulării, b) deficite cîştigate ale factorilor coagulării (în special în bolile ficatului), c) coagulopatii prin consum, date de utilizare excesivă a factorilor coagulării şi a trombocitelor în sindromele de coagulare intravasculară diseminată.

4. Inhibitorii coagulării pot fi anormal crescuţi în: a) hiperheparinemia postterapeutică sau mai rar în cursul leucemiilor cu mastocite, b) creşterea produşilor de degradare al fibrinogenului (în cursul stărilor de hiperfibrinoliză).

5. Sistemul fibrinolitic poate deveni hiperactiv în caz de a) scăderea inhibitorilor fibrinolizei (în special în afecţiunile hepatice grave), b) creşterea activatorilor fibrinolizei aşa cum se întîlneşte în cursul unor leucemii, a tumorilor de prostată sau în tratamentul trombolitic cu streptokinază.

Foarte adeseori sindroamele de coagulare intravasculară din stările de şoc şi septicemii realizează o coagulopatie prin consum şi o activare reactivă tranzitorie a fibrinolizei.

B. Considerentele de ordin practic vor ţine seama de:

1. Anamneza care poate releva existenţa unui deficit de coagulare cu caracter ereditar, antecedente hemoragice cu prilejul unor extracţii dentare, un tratament medicamentos anticoagulant sau care predispune la trombocitopenie, tulburări de absorbţie sau o afecţiune hepatică, o sarcină sau un avort.

2. Examenul clinic arată că de regulă trombocitopeniile şi vazopatiile se însoţesc de peteşii punctiforme pe cînd coagulopatiile grave evoluează cu echimoze întinse, hematoame şi hemartroze (mai ales în hemofilii). Coagularea intravasculară diseminată survine în cursul stărilor septice grave, în şoc şi în caz de hemoliză severă.

Scanned with OKEN Scanner

3. Examinările de laborator vor fi efectuate în etape interpretînd rezultatele în mod critic în ansamblu şi în funcţie de datele clinice. Redăm în tabelul 21 cîteva criterii de interpretare în principalele boli hemoragice, iar în Tabelul 23 diferenţierea între un deficit de factor VII şi deficitul de factor X.

TABEL 23

DIFERENŢIEREA ÎNTRE DEFICITUL DE FACTOR VII ŞI DEFICITUL DE FACTOR X

Metoda	*Deficit de factor VII*	*Deficit de factor VII şi IX*	*Deficit de factor X*
Timp de protrombină după Quick cu tromboplastină din creier	prelungit	prelungit	prelungit
Timpul Stypven	normal	normal	prelungit
Timpul de generare al tromboplastinei în prezenţa serului patologic.	normal	patologic	patologic
Testul de consum al protrombinei	normal	patologic	patologic
Timpul Howell	normal	prelungit	prelungit

Alături de bolile hemoragice analizate în tabelul 21 şi 22, mai amintim stările de hiperfibrinoliză şi coagulopatia prin consum ce survine în cursul sindroamelor de coagulare intravasculară diseminată. Redăm în tabelul 24, condiţiile în care pot apare astfel de stări şi criterii de recunoaştere.

Aşa cum reiese din tabelul 24. coagulopatia prin consum se caracterizează prin deficitul asociat al factorilor coagulării şi al plăcuţelor sanguine. De notat că sindroamele de coagulare intravasculară diseminată se pot însoţi de o activare secundară a fibrinolizei. Pentru detalii cu privire la coagularea intravasculară diseminată recomandăm monografia *Syndromes of Disseminated Intravascular Coagulation* de R. M. Hardaway, Ed. C. C. Thomas, Springfield Illinois U.S.A., 1966 şi articolul *Probleme legate de coagularea intravasculară diseminată* de M. Cucuianu şi I. Crîsnic Clujul medical, 44 (1971) p. 461—471.

Indicăm bibliografie pentru determinarea produşilor de degradare fibrinolitică:

C. Merskey, P. Lalezari, A. J. Johnson., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., (131 (1969) p. 871 şi pentru detectarea monomerilor de fibrină: B. Lipiski, K. Worowski, Thrombos. Diathes. Haemorrh., 20 (1968), p. 44.

Scanned with OKEN Scanner

TABEL 24

CRITERII DE DIFERENȚIERE A COAGULOPATIEI PRIN CONSUM FAȚĂ DE STĂRILE DE HIPERFIBRINOLIZĂ.

	Coagulopatia prin consum (coagularea intravasculară diseminată)	*Hiperfibrinoliză*
Etiologie	Survine în cursul accidentelor obstetricale (avort septic, deslipire prematură de placentă, embolie cu lichid amniotic), septicemii, peritonite, transfuzii incompatibile, stări de șoc, circulație extracorporală, leucemii acute cu distrugere masivă de elemente figurate.	Survine în ciroze hepatice avansate, în cursul intervențiilor pentru adenom de prostată, după tratament cu fibrinolitice (Streptokinază).
Manifestări	Evoluează cu fenomene trombohemoragice cu microtrombi, ce alterează capilarele și duc la necroză diseminată în rinichi, ficat, tubul digestiv, plămîni și uneori în hipofiză și suprarenale. Prăbușire tensională și adeseori șoc ireversibil.	Predomină fenomenele hemoragice pe tegument și mucoase fără apariția de necroze diseminate. Căderile de tensiune sînt în general reversibile.
Laborator	Scăderea fibrinogenului și factorilor II, V, VIII Trombocitopenie și deficit al funcților plachetare. Prezența monomerilor de fibrină în plasmă Scăderea marcată a factorului XIII Produșii de degradare ai fibrinei apar în caz de fibrinoliză secundară.	Scăderea fibrinogenului și factorilor II, V, VIII. Apariția produșilor de degradare ai fibrinogenului și fibrinei în ser Factorul XIII de regulă nemodificat.

Scanned with OKEN Scanner

DETERMINĂRI PE ERITROCITE

În ultimii ani s-au descris un mare număr de anomalii de metabolism, datorită deficitului în enzime eritrocitare. În fig. 53 se dau cîteva dintre aceste deficienţe.

1. | PREPARAREA HEMOLIZATULUI

Pentru determinarea enzimelor eritrocitare este necesar să se prepare un hemolizat lipsit de stromă. Se prelevează 1 *ml* sînge în soluţia ACD (vezi recoltarea sîngelui). În această soluţie care conţine glucoză, eritrocitele sînt viabile mai multe zile la 4°C, astfel încît nu este necesar să se efectueze analizele imediat.

Se centrifughează timp de 10 *min* *min* la 1500 *g*. Plasma, leucocitele şi la 1500 *g*. Plasma, leucocitele şi stratul superior sînt îndepărtate. Se adaugă cca 5 *ml* soluţie izotonică de $CaCl_2$ (1,19%) răcită în gheaţă, se amestecă bine, se centrifughează, se prelevează supernatantul şi se repetă spălarea.

Se adaugă exact 0,2 *ml* eritrocite la un volum de cel puţin 4 *ml* apă bidistilată şi se lasă în repaus cca 10 *min* la temperatura camerei. La începutul şi sfîrşitul acestui interval se agită bine. Se centrifughează pentru îndepărtarea stromei şi se reţine supernatantul clar.

Pe acest lichid se determină hemoglobina în *g/l* după metoda cu cianmethemoglobină sau prin dozarea oxihemoglobinei. Deoarece majoritatea enzimelor se găsesc solvite în eritrocit, se poate utiliza pentru determinări supernatantul. Excepţie face acetilcolinesteraza, care este în parte legată de stromă.

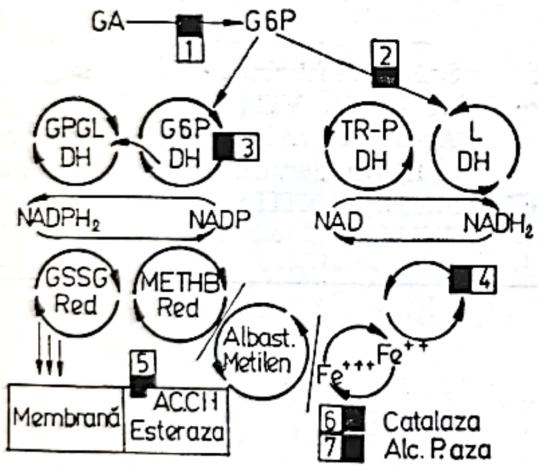


Fig. 53. Enzimopatii eritrocitare. 1, galactozemie (absenţa galactozo-1-fosfat-uridil-transferazei), 2. anemie hemolitică familială nesferocitară (absenţa piruvat-kinazei), 3, favism (absenţa glucozo-6-fosfatdehidrogenazei). 4, methemoglobinemie familială (absenţa methemoglobin-reductazei) 5, hemoglobinurie paroxistică nocturnă (absenţa acetil-colinesterazei), 6, acatalazie (absenţa catalazei), 7. hipofosfatazie (absenţa fosfatazei alcaline).

Pentru raportarea concentraţiei metaboliţilor sau a enzimelor în eritrocite, se pot utiliza diferite mărimi de referinţă. Este de preferat utilizarea ca bază de referinţă a conţinutului în hemoglobină al hemolizatului, fiindcă este o mărime care poate fi determinată exact relativ simplu. O altă mărime poate fi volumul celular sau numărul de eritrocite (determinat electronic).

2. DETERMINAREA GLUCOZO-6-FOSFAT DEHIDROGENAZEI (G-6-P dehidrogenaza) metodă de „Screening"

Principiu. După cum se vede în fig. 53, eritrocitele posedă capacitatea de a reduce NADP prin G-6-P dehidrogenaza (EL: 1.1.1.49) şi de a decolora albastrul de metilen plecînd de la $NADPH_2$ şi o flavinenzimă specifică. Viteza cu care albastrul de metilen este decolorat este proporţională cu activitatea enzimei.

Reactivi. 1) Tampon tris, 50 *mM*, $pH = 7{,}5$ (vezi prepararea la anexe). *2*) Soluţie de glucozo-6-fosfat 30 *mM:* se dizolvă 100 *mg* de sare disodică în apă bidistilată şi se aduce volumul la 10 *ml*. Stabilitatea nelimitată sub formă congelată. *3*) Soluţie de NADP 0,65 *mM*: se dizolvă 5 *mg* sare sodică în apă bidistilată şi se aduce volumul la 10 *ml*. *4*) Soluţie albastru de metilen 1 *mM:* se dizolvă 37 *mg* albastru de metilen în apă bidistilată şi se aduce volumul la 100 *ml*.

Tehnica. 1) Prepararea hemolizatului: se hemolizează 0,05 *ml* sînge capilar sau citratat în 3 *ml* apă bidistilată.

2) Se fac două probe paralele, în fiecare adăugîndu-se următoarele cantităţi: 1 *ml* hemolizat, 0,2 *ml* tampon, 0,1 *ml* soluţie NADP, 0,1 *ml* soluţie G-6-P, 0,25 *ml* soluţie albastru de metilen.

Se barbotează gaz metan timp de 2 *min* în probe şi se închid ermetic. Se incubează în baie de apă la 37°C luminînd eprubetele cu o lampă de 100 watt la o distanţă de 10 *cm* (reacţia depinde puternic de lumină). Se notează timpul necesar pentru decolorarea totală a albastrului de metilen, cu ajutorul unui cronometru.

Interpretare. Se apreciază activitatea enzimei în felul următor:

Timp de decolorare	*Activitatea enzimei*
Sub 10 min	mărită
10—18 *min*	normală
20—60 *min*	intermediară
peste 60 *min*	deficientă

BIBLIOGRAFIE

Tönz, O., Betke, K., Klin. Wschr., 40 (1962) 649. Richterich, R., *Chimie Clinique* Théorique et Pratique, Ed. Doin, Paris, 1967.

Scanned with OKEN Scanner

3. DETERMINAREA G-6-P DEHIDROGENAZEI PRIN TESTUL OPTIC

Principiu. Se determină reducerea NADP în reacţia catalizată de G-6-P dehidrogenază.

$$\text{G—6—P} + \text{NADP} \xrightarrow{pH = 7{,}5,\ M\text{Mg}^{+2}} \text{6-fosfo-gluconat} + \text{NADPH}_2$$

Condiţii de analiză. Concentraţiile finale sînt: G-6-P, 2,14 *mM*, NADP, 0,214 *mM*, trietanolamină, 50 *mM*, EDTA, 5 *mM*, $pH = 7{,}5$. Temperatura 25°C, durata de măsurare a activităţii între 0,5 şi 5 *min* şi grosimea stratului 1 *cm*, la 340 sau 366 *nm*.

Reactivi. Vezi prepararea soluţiilor pentru testele optice (cap. Noţiuni de analiză enzimatică).

Soluţiile pentru analiză. *Soluţia I:* soluţie de NADP (6 *mM*) 1 parte, soluţie de sulfat de magneziu (200 *mM*) 1 parte, tampon trietanolamină-EDTA (50 *mM*) 18 părţi.

Soluţia II: G-6-P (30 *mM*) 1 parte şi tampon trietanolamină-EDTA (50 *mM*) 18 părţi.

Tehnica. Se incubează, timp de 5 *min*, 0,5 *ml* soluţie I cu 0,1 *ml* hemolizat. Se controlează extincţia timp de 1 *min.* (nu trebuie să existe variaţii de extincţie). Se declanşează reacţia adăugînd 0,1 *ml* soluţie II şi se urmăreşte variaţia de extincţie timp de 0,5—5 *min.*

Calcul. 1) Cu ajutorul coeficientului de extincţie la 366 *nm*

$$\mu moli \cdot min^{-1}/g\ \text{Hb} = \frac{\Delta E/min}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}7}{0{,}1} \cdot 10^6 \cdot \frac{1}{C(\text{Hb})} = \Delta E/min \cdot \frac{2120}{C(\text{Hb})}$$

unde 3300 este coeficientul molar de absorbţie al $NADPH_2$ la 366 *nm* iar *C*(Hb) este concentraţia hemoglobinei în grame/1000 *ml* hemolizat. *2*) Cu ajutorul coeficientului de extincţie la 340 *nm:*

$$\mu moli \cdot min^{-1}/g\ \text{Hb} = \Delta E/min \cdot \frac{1125}{C(\text{Hb})}$$

Formula este calculată pentru volumele de lucru amintite, considerînd coeficientul molar de extincţie al NADP la 340 *nm* ca 6200.

Observaţii. 1) În cazul în care nu avem la dispoziţie microcuve se poate dubla volumul de reactivi. *2*) Metoda nu este absolut specifică pentru G-6-P dehidrogenază, deoarece 1/3 din activitatea măsurată este datorită unei oxidări ulterioare a 6-fosfo-gluconatului (de către dehidrogenaza respectivă). *3*) Activitatea este puţin stabilă în hemolizat, de aceea trebuie efectuată determinarea imediat după prepararea hemolizatului. *4*) Activitatea G-6-P-dehidrogenazei este mai mare

Scanned with OKEN Scanner

în reticulocite şi scade odată cu maturarea acestora. De aceea se recomandă să se procedeze şi la o numărare simultană a reticulocitelor. Se obţine astfel explicaţia unei activităţi mari în cazul unor anemii hemolitice. 5) În toate determinările de enzime eritrocitare, se recomandă să se efectueze cel puţin două determinări comparative pe subiecţi sănătoşi.

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie Clinique Théorique et Pratique*, Ed. Doin, Paris, 1967.

4. | METHEMOGLOBIN-REDUCTAZA

În eritrocite există un sistem complex de enzime care reduce constant methemoglobina formată. Proprietatea eritrocitelor intacte de reducere spontană a methemoglobinei în cursul incubării cu lactat sau glucoză serveşte ca măsură a activităţii enzimei.

Principiu. Hemoglobina din eritrocite se transformă integral prin nitratare în methemoglobină. În timpul incubării cu lactat methemoglobina este redusă în funcţie de activitatea methemoglobin-reductazei prezente. Se determină concentraţia methemoglobinei la începutul incubării şi după 4 ore.

Reactivi. 1) Azotit de sodiu 165 *mM* (izotonic): se dizolvă 1,14 *g* azotit de Na în apă bidistilată şi se aduce volumul la 100 *ml*. *2)* Lactat de sodiu 445 *mM:* se dizolvă 5 *g* lactat de sodiu şi se completează la 100 *ml* cu apă bidistilată. *3)* Soluţie de NaCl izotonică (0,9%). *4)* Tampon fosfat izotonic ($pH = 7{,}0$): vezi prepararea la anexă).

Tehnica. Se adaugă soluţie de nitrit în exces la cca 0,2 *ml* sînge citratat. După 15 *min* se spală de 6 ori cu soluţie de NaCl. Se face o suspensie a eritrocitelor brune într-o soluţie de NaCl tampon fosfat (9 părţi NaCl + o parte tampon), astfel încît concentraţia soluţiei să fie de 5—6 *g* hemoglobină/100 *ml*.

Se iau 1 *ml* suspensie şi 0,1 *ml* lactat de sodiu, se barbotează un gaz metan şi se închide tubul ermetic. Se incubează timp de 4 ore la 37°C, în baie de apă.

Calcul.

$$\text{Reducerea hemoglobinei} = \frac{\text{concentraţia met Hb după incubare} \cdot 100}{\text{concentraţia met Hb înainte de incubare}}$$

Valori normale: % h: 6,9—15,3.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie Clinique Théorique et Pratique*, Ed. Doin, Paris, 1967.

5. | PIRUVAT-KINAZA

Principiu. Ca sistem de măsurat se utilizează:

$$\text{fosfoenol-piruvat} + \text{ADP} \rightarrow \text{piruvat} + \text{ATP}$$

iar ca sistem indicator lactat dehidrogenaza:

$$\text{piruvat} + NADH_2 \rightarrow \text{lactat} + \text{NAD}$$

Reactivi. Vezi prepararea la Noţiuni de analiză enzimatică.

Soluţii de analiză. *Soluţia I:* tampon trietanolamină EDTA (50 *mM*) 14 părţi, $NADH_2$ (3 *mM*) 1 parte, ADP (30 *mM*) 1 parte, soluţie sulfat de magneziu (200 *mM*) 1 parte, soluţie de lactat dehidrogenază 2 părţi, soluţie de KCl (2 *M*) 1 parte.

Soluţia II: tampon EDTA-trietanolamină (50 *mM*), $pH = 7{,}5$ 4 părţi şi fosfoenol-piruvat (30 *mM*) 1 parte.

Condiţii de determinare. Concentraţii finale: fosfoenol-piruvat 0,86 *mM*, $NADH_2$ 0,107 *mM*, ADP 1,07 *mM*, $MgSO_4$ 7 *mM*, KCl 70 *mM*, lactat dehidrogenază cu activitate mai mare de 10.000 $\mu moli \cdot min^{-1} \cdot litru^{-1}$ trietanolamină 50 *mM*, EDTA 5 *mM;* temperatura 25°C; 340 sau 366 *nm*, d=1 *cm*.

Tehnica. Se incubează, timp de 5 *min*, 0,5 *ml* soluţie I cu 0,1 *ml* hemolizat, se controlează extincţia timp de 1 *min*, apoi se declanşează reacţia prin adausul a 0,1 *ml* soluţie II. Se măsoară variaţia de extincţie timp de 0,5—5 *min*.

Calcul. 1) La 366 *nm* (considerînd coeficientul molar de extincţie al $NADH_2$ ca 3300):

$$\mu moli \cdot min^{-1}/g \text{ Hb} = \frac{\Delta E/min}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}7}{0{,}1} \cdot 10^6 \cdot \frac{1^1}{C(\text{Hb})} = \Delta E/min \cdot \frac{2120}{C(\text{Hb})}$$

unde C(Hb) este concentraţia hemoglobinei în g/100 *ml* hemolizat.

2) La 340 *nm:*

$$\mu moli \cdot min^{-1}/g \text{ Hb} = \Delta E/min \cdot \frac{1125}{C(\text{Hb})}$$

considerînd coeficientul molar de extincţie al $NADH_2$ la 340 *nm* ca 6200.

Valori normale: $4{,}5 \pm 2{,}4$ $\mu moli \cdot min^{-1}/g$ Hb

Scanned with OKEN Scanner

Observaţii. 1) Metoda este absolut specifică pentru piruvat-kinază. *2)* Activitatea enzimatică este puţin stabilă în hemolizat, de aceea dozarea se va face imediat după recoltare.

BIBLIOGRAFIE

Fellenberg, R. von., Richterich, R., Aebi, H., Enzymol. biol. clin., 3 (1963) 240. Richterich, R., *Chimie Clinique Theorique et Pratique*, Ed. Doin, Paris, 1967.

6. | GLUTATION-REDUCTAZA

Principiu. Glutation oxidat + $NADPH_2$ ⟶ glutation redus + NADP.

Condiţii de analiză. Concentraţii finale: glutation oxidat 0,53 *mM*, $NADPH_2$ 0,214 *mM*, trietanolamină 50 *mM*, EDTA 5 *mM*, $pH = 7{,}5$; temperatura 25°C, 340 sau 366 *nm*, d = 1 *cm*.

Reactivi. Vezi Noţiuni de analiză enzimatică.

Soluţii de analiză. *Soluţia I:* soluţie *de* $NADPH_2$ (6 *mM*) 1 parte, tampon trietanolamină-EDTA 19 părţi; *Soluţia II:* glutation oxidat (75 *mM*) 1 parte, tampon trietanolamină-EDTA 19 părţi.

Tehnica. Se incubează timp de 5 *min* 0,5 *ml* soluţie I, cu 0,1 *ml* hemolizat, se controlează extincţia timp de 1 *min*, apoi se declanşează reacţia adăugînd 0,1 *ml* soluţie II. Se măsoară variaţia de extincţie 1—5 *min*.

Calcul. 1) La 366 *nm* (considerînd coeficientul molar de extincţie al $NADPH_2$ egal cu 3300):

$$\mu moli \cdot min^{-1}/g \text{ Hb} = \frac{\Delta E/min}{3300 \cdot 1} \cdot \frac{0{,}7}{0{,}1} \cdot 10^6 \cdot \frac{1}{C(\text{Hb})} = \Delta E/min \cdot \frac{2120}{C(\text{Hb})}$$

2) La 340 *nm* (coeficientul molar de extincţie = 6200):

$$\mu moli \cdot min^{-1}/g \text{ Hb} = \Delta E/min \cdot \frac{1125}{C(\text{Hb})}$$

Valori normale: 0,7—1,7 $\mu moli \cdot min^{-1}/g$ Hb.

Observaţii. 1) Metoda este absolut specifică pentru glutation-reductază. Enzima este foarte sensibilă la urmele de metale grele. *2)* Enzima este deficitară în unele cazuri de anemii familiale în care administrarea unor medicamente declanşează crize hemolitice.

BIBLIOGRAFIE

Horn, H. D., *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Ed. H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse, 1962. Richterich, R., *Chimie clinique théorique et pratique*, Ed. Doin, Paris, 1967.

Scanned with OKEN Scanner

ANALIZA LICHIDULUI CEFALO-RAHIDIAN

Recoltarea lichidului cefalo-rahidian (LCR) se face prin puncţie lombară sau suboccipitală.

Aspectul normal al LCR este clar şi incolor. În tabelul 25 redăm proprietăţile fizice şi compoziţia LCR în comparaţie cu plasma.

TABEL 25

PROPRIETĂŢILE FIZICE ŞI COMPOZIŢIA LICHIDULUI CEFALO-RAHIDIAN ÎN COMPARAŢIE CU PLASMA.

	Component	LCR	Plasmă (valoare medie)
I. Proprietăţi fizice	Culoare	limpede	gălbuie,
	Cantitate (*ml*)	100—200	3000
	Producţie zilnică (*ml*)	cca 700	—
	Densitate	1,004—1,009	1024—1028
	pH	7,4	7,4
	Presiunea (*cm* H_2O)		
	— copii	5—10	—
	— adulţi	7—20	—
II. Celule	nr. celule/nm^3	0—3	—
III. Dozări chimice (*mg*/100 *ml*)	Proteine totale	20—40	6500
	Albumine	15—30	4000
	Globuline	4—9	2500
	Fibrinogen	0	200
	N-rezidual	11—20	25
	N-aminoacidic	1,6—2,7	4,4
	N-ureic	7,5—15,0	25
	Acid uric	0,5—2,6	4,0
	Amoniac	1,0	0,8
	Creatinină	1,0—1,5	1,0
	Glucoză	45—80	70
	Colesterol	0,06—0,5	200
	Bilirubină	0,2	0,8
	Calciu	4,1—5,9	10
	Fosfor anorganic	1,3—1,5	3,5
(*mEq*/litru)	Sodiu	129—153	145
	Potasiu	2,06—3,86	4
	Cloruri	120—130	104
(*µMol/min/l*) 25 °C	Lactatdehidrogenaza	1,6—18,4	90
	Glutamicooxalacetico-transaminaza	1,9—12,9	12

Scanned with OKEN Scanner

În mod patologic aspectul se poate modifica în felul următor: *lichid hemoragic* (în hemoragii meningee și meningite hemoragice); *lichid xantocromic* (în hemoragii meningee vechi); *lichid tulbure* (în meningitele purulente).

Un aspect particular este formarea unui văl de fibrină la suprafață, în cazul meningitei tuberculoase și rareori în meningita limfocitară.

Examenul chimic obișnuit constă în determinarea proteinelor, dozarea glucozei, dozarea clorurilor. În mod special se pot face și alte determinări.

1. | DETERMINAREA PROTEINELOR

Cercetarea creșterii proteinelor se face prin reacții calitative, dozare semicantitativă sau dozare prin metoda biuretului.

1.1. | Probe calitative pentru evidențierea globulinelor

1.1.1. | REACȚIA PANDY

Principiu. Creșterea concentrației proteinelor în LCR face ca la contactul acestuia cu o soluție saturată de fenol să apară o opalescență.

Reactiv Pandy (soluție saturată de fenol): 10 g fenol se agită cu 100 *ml* apă distilată, se lasă în termostat cîteva ore la 37°, apoi cîteva zile la temperatura camerei. Se utilizează soluția de deasupra stratului de fenol depus pe fundul vasului.

Tehnica. Pe o sticlă de ceas se aplică o picătură de LCR peste 1 *ml* reactiv Pandy. Dacă lichidul este patologic, apare o tulburare, care se intensifică treptat și se notează astfel: ± opalescent (poate fi întîlnit și la normali); + slab pozitiv; ++ tulburare ușoară, +++ tulburare intensă; ++++ aspect lăptos (reacție foarte intens pozitivă).

1.1.2. | REACȚIA NONNE—APPELT

Principiu. Globulinele precipită cu o soluție semisaturată de sulfat de amoniu.

Reactiv Nonne—Appelt (soluție saturată de sulfat de amoniu). Se dizolvă 85 g sulfat de amoniu în 100 *ml* apă fierbinte. Se lasă peste noapte la temperatura camerei și se filtrează. Dacă soluția este acidă (la preparare sau prin ședere) se va neutraliza cu amoniac.

Tehnica. Într-o eprubetă de hemoliză se pun 1 *ml* de reactiv peste o cantitate egală de LCR și se urmărește apariția unui inel tul-

Scanned with OKEN Scanner

bure la limita de separaţie, după 3 *min.* Se notează în felul următor: + opalescenţă slabă; ++ opalescenţă; +++ tulburare lăptoasă; reacţia este mai puţin sensibilă ca reacţia Pandy.

Interpretare. Reacţiile devin pozitive în cazul creşterii patologice a proteinelor din LCR (vezi dozarea proteinelor).

1.2. | Determinarea semicantitativă a proteinelor

Se face cu rahialbuminometrul Sicard-Cantaloube, care este un tub subţire gradat pînă la 4 *ml.* Primii *2 ml* reprezintă 5 subdiviziuni, în raport cu acestea citindu-se rezultatul.

Tehnica. Se introduc în tub 4 *ml* LCR, se încălzesc la 80—90°, apoi se adaugă 12 picături soluţie de acid tricloracetic 30%. Se astupă tubul cu un dop, se agită şi apoi se lasă în repaus în poziţie verticală timp de 24 ore.

Se citeşte nivelul precipitatului format în 24 de ore. Corespondenţa dintre diviziuni şi concentraţia în proteine a LCR este următoarea: diviziunea 1: 22 *mg*%; diviziunea 2: 40 *mg*%; diviziunea 3: 56 *mg*%; diviziunea 4: 71 *mg*%; diviziunea 5: 85 *mg*%.

Interpretare. În mod normal conţinutul de proteine este de 15—30 *mg*%. O creştere a proteinelor poate apare în poliradiculonevrite, compresiuni medulare, paralizie generală progresivă, meningite.

1.3. | Dozarea cantitativă a proteinelor

Concentraţia proteinelor în LCR fiind de 200 ori mai scăzută decît în ser, dozarea proteinelor pune probleme speciale.

Se pot utiliza următoarele metode:

a. Metode semicantitative care dau rezultate puţin exacte. S-a descris înainte determinarea cu rahialbuminometru.

b. Măsurarea extincţiei LCR la 280 *nm* nu este adecvată fiindcă în LCR raportul între proteine şi alte substanţe care absorb la 280 *nm* este scăzut.

c. Metoda Kjeldahl, dozarea azotului total şi a celui neproteic şi calcularea concentraţiei proteinelor prin diferenţă. Este prea laborioasă şi necesită cantităţi mari de LCR.

d. Metoda Folin—Ciocâlteu (Lowry) este potrivită ca sensibilitate, dar există medicamente care interferează în determinări (în special salicilaţii).

e. Metoda biuretului, aplicată direct nu prezintă sensibilitatea necesară, dar dă bune rezultate dacă se precipită proteinele în prealabil

Scanned with OKEN Scanner

și se efectuează reacția biuretului pe precipitat. Se va descrie această metodă.

Principiu. Proteinele din LCR sînt precipitate cu acid percloric iar precipitatul este dizolvat în reactivul biuretului, în prezența căruia produce o colorație violetă.

Reactivi. 1) Acid percloric 6,6%. *2*) Prepararea reactivului Gornall și a soluției standard de proteină au fost descrise la dozarea proteinelor serice.

Tehnica. 1) Se pune într-o eprubetă 0,1 *ml* acid percloric și se răcește la gheață. Se adaugă 1 *ml* de LCR (eventual 0,5 *ml*) și se amestecă bine. Se lasă 10 *min.*, apoi se centrifughează și se aruncă supernatantul. Peste precipitat se adaugă 1 *ml* reactiv Gornall. Se face o probă în alb cu 20 *µl* apă distilată și 1 *ml* reactiv Gornall și un standard cu 20 *µl* soluție standard de proteină și 1 *ml* reactiv Gornall. După 30 *min.*, se citește extincția probei și a standardului față de proba în alb, la 540 *nm*, în cuvă de 1 *cm*.

Calcul. 1) Cu ajutorul standardului:

$$mg \text{ prot./100 } ml = \frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \cdot C_{\text{standard}} \, (mg\%) \cdot \frac{0{,}02}{1{,}00}$$

Dacă se lucrează cu 0,5 *ml* LCR se înmulțește rezultatul cu 2 la sfîrșitul calculului.

Valori normale: pînă la 40 *mg*%.

2. DOZAREA GLUCOZEI

Se face după una din metodele descrise la sînge. Dacă analiza nu se face imediat, se va congela LCR pînă la efectuarea determinării.

Valorile normale sînt cuprinse între 45—80 *mg*%. Glicorahia scade în meningita tuberculoasă și purulentă.

3. DOZAREA CLORURILOR

În cazul LCR rezultatul se exprimă de obiceiu în NaCl (g/litru). Se pot folosi mai multe metode:

a) Tehnica Schales; se lucrează ca și la urină, plecînd cu 1 *ml* LCR.

b) Metoda Mohr; ca și la urină, plecînd cu 2 *ml* LCR.

Valori normale: copii $7 \pm 0{,}50$ *g*/litru; adulți: $7{,}30 \pm 0{,}15$ *g*/litru. (Exprimate în *mE*q/l, valorile normale sînt de 120 — 130 *mE*q/l).

Variații patologice. Creșteri peste 7,50 *g*/litru se întîlnesc în uremie și nefrite cu edeme. Valori scăzute sînt întîlnite în meningite și

Scanned with OKEN Scanner

în special în meningita tuberculoasă. Deobicei, valorile sînt sub 6,50 g/litru, mai frecvent între 5—6 g/litru. Modificările clorurilor în LCR se vor interpreta în legătură cu modificările proteinelor şi cu modificările celulare (creşterea limfocitelor pledînd şi ea pentru o meningită tuberculoasă).

4. ALTE DETERMINĂRI ÎN LCR

1) Electroforeza lichidului cefalo-rahidian: separă următoarele fracţiuni proteice: prealbumine = 4,3%; albumine = 51,2%; alfa$_1$-globuline = 5,8%; alfa$_2$-globuline = 8,4%; beta-globuline = 17,1%; globuline π = 6,1% şi gama-globuline = 6,3%. O creştere a gama-globulinelor se întîlneşte în scleroza în plăci şi în tumorile cerebrale. Procedeul de concentrare al proteinelor în LCR (vezi pag. 125).

2) Imunoelectroforeza permite evidenţierea creşterii fracţiunii gama-G (Ig G) în scleroza în plăci şi a creşterii gama-A (Ig A) şi gama M (Ig M) în afecţiuni inflamatorii.

3) Determinarea unor enzime. Se practică uneori determinarea activităţii lactat-dehidrogenazei (prin metoda descrisă la ser) şi a glutamico-oxalacetico-transaminazei (vezi la ser).

4) Identificarea unor pigmenţi. Bilirubina, se utilizează metoda spectrofotometrică directă (vezi la ser); oxihemoglobina, se determină după metoda indicată la sînge; de cele mai multe ori nu e nevoie de diluare; methemoglobina, se determină după metoda indicată la analiza sîngelui.

Identificarea pigmenţilor în LCR poate avea semnificaţie diagnostică (vezi tabelul 26).

TABEL 26

SEMNIFICAŢIA PIGMENŢILOR ÎN LCR

Boala	*Pigmenţi*
Hemoragii (subarahnoidiene sau ventriculare)	Oxihemoglobină + bilirubină
Hematom subdural	Methemoglobină
Bloc (spinal, subarahnoidian, ventricular)	Bilirubină
Icter în boli hepatice	Bilirubină
Tumori subdurale	Bilirubină
Lichidul chistelor	Bilirubină
Traumatism prin puncţie (supernatant)	Negativ

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., *Chimie Clinique Théorique et Pratique*, Ed. Doin, Paris, 1967. Cîmpeanu, E., sub red., Curs Neurologie, IMF Cluj, 1973, Todorov, I., *Klinische Untersuchungen im Kindesalter*, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1970.

Scanned with OKEN Scanner

ANALIZA URINEI

1. RECOLTAREA URINEI

Analiza completă a urinei se efectuează pe urina din 24 ore, în timp ce un examen sumar de urină, care constă din determinarea densităţii, identificarea prin reacţii calitative a componenţilor patologici urinari, analiza sedimentului urinar, se poate face pe urina de dimineaţă, care este mai concentrată. Pentru recoltarea urinei din 24 ore bolnavul va urina dimineaţa la o oră fixă, aruncînd această urină. În continuare se va colecta urina într-un vas pînă a doua zi dimineaţa, cînd bolnavul va urina ultima oară exact la ora la care s-a început colectarea urinei. Se adaugă şi această cantitate de urină celei colectate pînă atunci. Pentru a preveni alterarea urinei în cursul colectării se pot utiliza conservanţi ca: timol (1—2 *g*), toluen, xilen sau cloroform (5—10 *ml*), soluţie 10% timol în cloroform (5—10 *ml*). Aceşti conservanţi se pun în vasul în care se colectează urina. Nu se întrebuinţează cloroformul dacă se cere determinarea glicozuriei sau acetonuriei, cloroformul fiind reducător. În momentul analizei, conservantul (cloroform sau toluen) se va separa de urină cu ajutorul unei pîlnii de separaţie. Conservanţii nu se pot utiliza dacă se va face şi un examen bacteriologic.

2. EXAMENE PRELIMINARE ALE URINEI

1) Cantitatea de urină emisă

În mod normal, urina emisă în 24 ore este: la bărbaţi, de 1500—2000 *ml*, iar la femei, de 1000—1500 *ml*. Variaţii fiziologice ale volumului urinei sînt legate de ingestia de lichide şi de cantitatea de apă eliminată pe alte căi (de pildă prin transpiraţie în efortul fizic). În cazul unui aport hidric obişnuit sînt considerate patologice cantităţi de urină sub 500 *ml* (oligurie) şi peste 2000 *ml* (poliurie).

---

* Cu excepţia cîtorva analize la care bibliografia este în mod special indicată, tehnica şi interpretarea examinărilor de urină au fost preluate după:

— Manta, I., Ciplea, G., *Metodele laboratorului clinic*, Cartea Romînească, Cluj, 1947.

— Richterich, R., *Chimie Clinique Théorique et Pratique*, Doin, Paris, 1967.

— Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., Inwood, M. J. H., *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology*, Ed. W. B. Saunders, Philadelphia—London—Toronto, 1969.

Bedeleanu, D. şi colab., *Lucrări practice de biochimie*, I.M.F. CLUJ-NAPOCA, 1967.

Scanned with OKEN Scanner

Oliguria se înregistrează în boli renale, obstrucţia căilor urinare (calculi, tumori), retenţie de urină postoperator, transpiraţie, febră, formarea edemelor şi a altor colecţii lichidiene.

Anuria se întîlneşte în insuficienţele renale acute.

Poliuria se întîlneşte în diabet zaharat, diabet insipid, resorbţia edemelor şi a colecţiilor lichidiene, după crizele epileptice şi migrene, în sclerozele renale.

Polakiuria (micţiuni frecvente, cantitatea totală de urină fiind normală) apare în: cistite, pielite, adenom de prostată.

Nicturia (eliminarea unei cantităţi mai mari de urină în cursul nopţii) se înregistrează în insuficienţa cardiacă, inflamaţii ale căilor urinare. În mod normal, 80% din cantitatea de urină din 24 ore se elimină în timpul zilei.

2) *Culoarea urinei*

În mod normal, culoarea urinei variază de la galben la roşu brun, după concentraţie şi compoziţie. După masă, urina este mai deschisă fiind mai puţin acidă, pe cînd cea din cursul nopţii, mai acidă, este mai închisă la culoare. În regimul carnat, urina are o culoare mai închisă, pe cînd în regimul vegetarian are o culoare mai deschisă (vezi tabelul 27).

TABEL 27

CULORI ANORMALE ALE URINEI ŞI CONDIŢIILE ÎN CARE APAR

Culori anormale	*Condiţii în care apar*
galbenă foarte clară aproape incoloră	Diureză apoasă, diabet insipid (cu densitate joasă), tratament cu diuretice, faza poliurică a insuficienţei renale.
galben-lămîie	Sena, cascara sagrada, crisarobină (în urină acidă).
galben-safran	Santonină (urină acidă), bilirubină
galben-verzui pînă la brun	Pigmenţi biliari (ictere)
galben-portocaliu	Administrarea restrînsă de lichide, febră, urobilinogen, derivaţi de pirazolon; sulfamide, antipirină, piramidon.
roşu-portocaliu	Sena, Cascara sagrada, crisarobină (urină alcalină)
roşu	Sînge, hemoglobină, piramidon, antipirină, coloranţi de anilină, sfeclă roşie, santonină (urină alcalină)
roşu purpuriu	Fenolftaleină, roşu de fenol (PSP) (urină alcalină)
roşu bordo	Porfirine
brun	Methemoglobină, bilirubină, porfirine, fenoli, rezorcină, timol, salol, pirogalol, tanin, naftalină, acid salicilic, alcaptonurie şi melanurie (urina se colorează în cursul păstrării)
Alb lăptos	picături de lipide (chilurie-lipurie)
verde sau albastru	Albastru de metilen
verde murdar prin	Indican în exces

Scanned with OKEN Scanner

3) *Transparența urinei*

În mod normal urina este clară (limpede și transparentă). În timpul colectării poate deveni tulbure.

Tulburările patologice se pot diferenția în felul următor: Tulburarea produsă de acid uric, urați, oxalați, dispare la încălzire. Fosfații formează un depozit alb care devine mai abundent la încălzire și dispare la adausul de acid acetic. De asemenea precipitatele cristaline (fosfați amoniaco-magnezieni) sau amorfe (carbonat de calciu) dispar prin adăugarea cîtorva picături de acid acetic glacial. Tulburarea datorită oxalatului de calciu dispare numai la adaos de acid clorhidric. Tulburarea produsă de microbi și în cazurile de piurie nu dispare la încălzire și adăugare de acizi. În sfîrșit, urina tulbure se mai întîlnește în cazurile rare de chilurie sau după administrarerea de sulfamide puțin solubile.

4) *Mirosul urinei*

La emisie, urina prezintă un miros caracteristic, slab, care se modifică în cursul păstrării prin fermentație. Un miros de acetonă sau mere indică prezența unor cantități mari de corpi cetonici (de exemplu în diabet), iar un miros fetid se întîlnește în cistite. După ingerarea unor alimente (sparanghel, hrean, usturoi), urina prezintă un miros neplăcut foarte accentuat, datorită mercaptanilor formați. Un miros puternic neobișnuit al urinei la copiii nou-născuți trebuie să trezească bănuiala unei erori metabolice (aminoacidopatie).

5) *Densitatea urinei*

Aparatura. 1. Urodensimetru; 2. Cilindru gradat de 50 *ml;* 3. Termometru.

Tehnica. Urina filtrată se toarnă în cilindru gradat și se introduce în ea urodensimetrul, care trebuie să plutească fără a atinge pereții cilindrului. Dacă există spumă la suprafața urinei se îndepărtează cu hîrtie de filtru. Se citește pe urodensimetru diviziunea care este tangentă cu meniscul inferior al urinei. Urodensimetrele sînt de obicei etalonate pentru 15°C. De aceea se ia și temperatura urinei, făcînd o corecție a densității, adăugînd, la fiecare depășire cu 3 grade a temperaturii de 15°C, cîte o unitate la ultima zecimală (0,001) și scăzînd cîte 0,001, pentru fiecare 3° de temperatură sub 15°C.

Interpretare. În mod normal, urina din 24 ore are o densitate cuprinsă între 1,015—1,025. Există variații fiziologice în funcție de aportul și eliminarea apei. Densitatea urinei este mai mică în cazurile de poliurie și mai mare în oligurie. În condiții patologice, densitatea

Scanned with OKEN Scanner

urinei este crescută în cazuri de febră, boli cardiace, diabet zaharat (deşi în această ultimă situaţie există poliurie).

Densitatea urinei este un indicator al capacităţii de concentrare a rinichiului, fiind scăzută în insuficienţa renală. Aceasta se exclude dacă se determină separat densitatea probelor de urină emisă în 24 ore şi pe o probă se găseşte o densitate peste 1,025. În insuficienţa renală gravă pe toate probele densitatea este de 1,010—1,011 (izostenurie). Densitatea poate fi modificată şi la concentraţii mari de glucoză sau de proteină (în acest ultim caz urina trebuie deproteinizată). Astfel, o creştere a densităţii de 0,001 este produsă de 1,47 g NaCl sau 3,6 g ureea sau 2,7 g glucoză, sau 3,9 g proteină la un litru de urină.

6) *Reacţia urinei (pH-ul).*

Se determină pe urina proaspătă.

Metoda Guillaumin

Indicator: Se amestecă într-un mojar 0,125 g roşu de metil, 0,40 g albastru de brom timol cu hidroxid de sodiu *N*/20 necesar pentru dizolvare (cca 19 *ml*). Se adaugă apoi apă distilată şi se transferă cantitativ într-un balon gradat de 1 litru, apoi se completează la semn cu apă distilată.

Tehnica. Se ia întîi densitatea urinei. Dacă este sub 1,010 se trece mai departe, dacă densitatea este mai mare se diluează cu apă (1 vol. urină + 4 vol. apă distilată).

Se iau 10 *ml* urină, se adaugă 10 picături de indicator şi se compară culoarea soluţiei cu acelea dintr-un tablou. În lipsa acestuia se compară culoarea soluţiei cu o scară de *pH* preparată cu indicator adăugat la soluţii tampon cu *pH* cunoscut; 4,6; 5,5; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6; 7,0. Există astăzi posibilitatea determinării *pH*-ului cu ajutorul *pH*-metrelor de precizie.

Interpretare. În cazul unui regim alimentar echilibrat urina proaspătă este în mod normal uşor acidă. Este net acidă în cazul regimului carnat (datorită produşilor finali ai metabolismului proteic) şi uşor alcalină în regimul vegetarian, variaţiile normale fiind între 4,7 pînă la 8,0. Aceste variaţii se datoresc faptului că în regimul vegetarian produşii de metabolizare sînt CO_2 şi H_2O, care se elimină pe alte căi, astfel că în urină se elimină sărurile care au neutralizat în alimentele ingerate radicalii organici. Există şi variaţii nictemerale ale *pH*-ului urinar. Dimineaţa urina este mai acidă, iar după alimentaţie devine mai alcalină, deoarece ionii H^+ sînt utilizaţi în digestia gastrică. În achilie nu se înregistrează această variaţie.

Scanned with OKEN Scanner

Urina este acidă în diabetul zaharat (acidoză diabetică, datorită corpilor cetonici) și în insuficiența renală (rinichiul nu mai produce amoniacul necesar neutralizării radicalilor acizi). Urina este mai alcalină după vărsături abundente, în timpul resorbției edemelor, în infecțiile urinare și după administrare de medicamente alcaline (de exemplu bicarbonat de Na), ape minerale alcaline.

Se poate realiza o probă funcțională de apreciere a acidozei determinînd *pH*-ul urinar. Se determină cantitatea de bicarbonat de sodiu, care trebuie administrată unei persoane pentru ca urina să devină alcalină. Pentru un om sănătos este suficientă o cantitate de 10 *g* bicarbonat administrat per os, în timp ce în acidoză (diabet), este necesară o cantitate de 30 *g*.

3. ANALIZA COMPUȘILOR PATOLOGICI DIN URINĂ

3.1. Proteinele

În mod normal, urina nu conține decît urme de proteine (albumine și globuline ce provin din plasmă), în cantitate de 20—40 *mg*‰, care nu se pot decela prin tehnicile uzuale.

Analizele se fac pe urină clară. Urina tulbure se centrifughează sau se filtrează, sau în rarele cazuri de lipurie se vor extrage lipidele prin agitare cu eter. Tulbureala datorită uraților, se elimină prin încălzire ușoară. Dacă și după centrifughare sau filtrare se menține o slabă tulbureală se vor face probe în paralel, urmărindu-se intensificarea tulburelii. Analiza nu are valoare dacă urina este contaminată cu materiale biologice care conțin proteine (de exemplu sîngele menstrual). Reacția urinei trebuie să fie slab acidă la emisie sau în caz contrar, se acidulează urina cu cîteva picături de acid acetic. Dacă la emisie urina prezintă o reacție net alcalină, depistarea devine nesigură, fiindcă în infecțiile vezicii urinare, urina suferă un început de fermentare amoniacală, care transformă albuminele în alcali-albumine denaturate, ce pierd unele proprietăți utilizate în depistarea lor.

Proteinurii patologice apar în afecțiunile renale, boli ale căilor urinare, stări febrile, intoxicații, boli cardiace, ictere.

3.1.1. REACȚII DE IDENTIFICARE A PROTEINELOR URINARE

3.1.1.1. PROBA PRIN ÎNCĂLZIRE ÎN PREZENȚA ACIDULUI ACETIC

Reactivi. 1. Soluție de acid acetic 30%. *2.* Soluție concentrată de NaCl.

Tehnică. Se introduc într-o eprubetă aproximativ 10 *ml* urină. Se încălzește pînă la fierbere doar partea superioară a lichidului. Apa-

Scanned with OKEN Scanner

riția unei tulburări poate fi datorită fosfaților, carbonaților sau proteinelor. Dacă prin adăugarea a cîtorva picături de acid acetic tulbureala dispare, proba indică prezența fosfaților sau carbonaților. Dacă tulbureala persistă sau se intensifică, prezența proteinei este sigură.

Cauze de eroare. Dacă urina este săracă în săruri, proteinele nu precipită. Este suficientă adăugarea cîtorva picături din soluția concentrată de NaCl pentru ca să apară precipitatul. Dacă se adaugă prea mult acid acetic, proteinele se pot redizolva prin depășirea punctului izoelectric. O reacție slab pozitivă pot da și mucoproteinele urinare. Diferențierea lor se face prin proba Grimbert și Dufau (vezi mai departe).

3.1.1.2. | PROBA CU ACID SULFOSALICILIC

Reactivi. Acid sulfosalicilic 20%.

Tehnică. Se iau într-o eprubetă aproximativ 5 *ml* urină și se adaugă 5—10 picături de acid sulfosalicilic. După cantitatea de proteine prezente, apare o tulbureală sau un precipitat. Dacă tulbureala persistă la încălzire, sînt prezente proteinele; dacă dispare la încălzire, sînt prezente albumozele. Este o probă foarte sensibilă (detectează 0,015 g% proteine).

Sursă de eroare. Reacții fals pozitive se observă în terapia diabetului cu antidiabetice orale.

3.1.1.3. | PROBA CU ACID TRICLORACETIC

Reactiv. Soluție de acid tricloracetic 10—20%.

Tehnică. Se iau într-o eprubetă aproximativ 5 *ml* urină și se adaugă 1 *ml* acid tricloracetic. Formarea unui precipitat alb floconos indică prezența proteinelor.

3.1.1.4. | PROBA ESBACH

Reactiv. Reactivul Esbach: acid picric 10 *g*, acid citric crist. 20 *g* și apă distilată ad 1000 *ml*.

Tehnică. Se pun într-o eprubetă aproximativ 5 *ml* urină și se adaugă 1 *ml* reactiv Esbach. În prezența proteinelor apare un precipitat alb-galben.

3.1.1.5. | PROBA CU ACID AZOTIC (HELLER)

Reactiv. Acid azotic concentrat.

Tehnică. Se iau într-o eprubetă 1—2 *ml* acid azotic concentrat și se lasă să se prelingă pe pereții eprubetei aproximativ 2 *ml* urină.

Scanned with OKEN Scanner

Apariţia unui precipitat sub formă de inel la zona de contact dintre cele două soluţii, indică prezenţa proteinelor.

Sursă de eroare. Urina conservată cu timol sau care conţine uree şi uraţi în cantitate mare, precipită de asemenea cu acidul azotic. Pentru a înlătura eroarea, se diluează în prealabil urina 1 : 2 cu apă. Dacă urina conţine mucoproteine secretate de mucoasa căilor urinare („mucine" sau „mucoid"), poate apare o tulbureală în stratul de urină care nu este delimitată sub formă de inel şi este mai exprimată în urina diluată, decît în cea nediluată. Pentru diferenţiere de proteinurie adevărată, se va face proba cu acid citric (Grimbert şi Dufau).

3.1.1.6. PROBA GRIMBERT ŞI DUFAU (EVIDENŢIEREA MUCOPROTEINELOR)

Se face o soluţie de acid citric: 100 *g* acid + 75 *ml* apă. Se iau într-o eprubetă cîţiva *ml* soluţie şi se lasă urina încet pe pereţi.

Dacă urina nu conţine decît mucoide, se observă absenţa inelului la zona de separaţie şi o zonă nebuloasă deasupra zonei de separaţie. Acelaşi lucru se observă în proba cu acid azotic, care se va face în paralel.

Dacă urina conţine proteine, se observă un inel în proba cu acid azotic şi nu se observă nici o tulbureală în proba cu acid citric.

Dacă urina conţine şi mucoide şi albumine, se observă în proba cu acid azotic formarea inelului la suprafaţa de separaţie a lichidelor, iar deasupra acestuia o a doua zonă nebuloasă datorită pseudoalbuminelor.

3.1.1.7. EVIDENŢIEREA PROTEINELOR BENCE—JONES (TERMOSOLUBILE)

Proteinele Bence—Jones reprezintă monomeri şi dimeri (uneori şi tri- şi tetrameri) ai lanţurilor uşoare (L) de imunoglobuline. Ele apar în 60% din cazurile de mieloame multiple şi ocazional în alte boli care afectează măduva osoasă: leucemii, osteosarcoame, metastaze osoase, unele disproteinemii.

Principiu. În urina slab acidă proteinele Bence—Jones precipită între 45—55°C şi se redizolvă în apropiere de 100°C. Precipitarea este precedată de agregarea moleculelor, care este foarte sensibilă la *pH*, tăria ionică şi compoziţia electrolitică a mediului. Prin scăderea *pH*-ului agregarea încetează la *pH* 4, sub care apar alterări ale moleculelor. Precipitarea optimă se produce la *pH* 4,6—5,4.

Reactivi. Tampon acetat 2 *N*, *pH* = 4,9; se dizolvă 17,5 g acetat de sodiu trihidratat în cca 80 *ml* apă distilată, în balon cotat

Scanned with OKEN Scanner

de 100 *ml*. Se adaugă 4,1 *ml* acid acetic glacial şi se aduce la 100 cu apă distilată. Se agită *pH*-ul final trebuie să fie $4,9 \pm 0,1$.

Tehnica. Se pun 4 *ml* urină într-o eprubetă, se adaugă 1 *ml* tampon acetat, $pH = 4,9$, şi se incubează în baie de apă la 56°C. Dacă apare un precipitat, este suspectată prezenţa proteinelor Bence—Jones. Apoi se introduce eprubeta în apă la fierbere timp de 3 minute şi se observă în continuare. Orice descreştere a cantităţii de precipitat sau clarifiere a tulburelii confirmă prezenţa proteinelor Bence—Jones. Prin răcire la 56°C reapare precipitatul iniţial. Se vor face în continuare analiza electroforetică şi identificarea caracteristicilor antigenice prin imunodifuzie în gel de agar.

3.1.2. DOZAREA PROTEINELOR URINARE

3.1.2.1. DOZAREA SEMICANTITATIVĂ ESBACH

Principiu. Se determină într-o eprubetă gradată (albuminometru Esbach) cantitatea de precipitat obţinut prin tratarea urinei cu reactiv Esbach. În această metodă, urina trebuie să fie acidă, de aceea dacă este cazul, se acidulează cu acid acetic. Se utilizează o urină cu densitate 1,008, făcînd, în caz că este nevoie, diluarea urinei, de care se ţine seama la calcul. Se va dilua urina şi în cazul cînd concentraţia albuminei este peste 0,4%. Reactivul Esbach este descris la probele calitative.

Tehnica. Se introduce în albuminometru Esbach urină pînă la semnul U şi apoi reactiv Esbach pînă la semnul R, se închide cu un dop de cauciuc şi se agită bine, apoi se lasă în repaus. Se citeşte după 24 ore înălţimea precipitatului, diviziunile exprimînd grame proteine la 1000 *ml* urină.

Pentru a grăbi precipitarea se va adăuga un vîrf de cuţit de piatră ponce pulverizată, talc sau caolin, citirea putîndu-se face, în acest caz, după un sfert de oră.

Observaţie. Reactivul Esbach precipită nu numai albuminele, ci şi albumozele, mucoidele, acidul uric, alcaloizii, urotropina. Înălţimea sedimentului depinde de temperatură.

3.1.2.2. METODA CU ACID SULFOSALICILIC

Principiu. Proteinele sînt precipitate cu acid sulfosalicilic, iar gradul de turbiditate produsă este determinat fotometric, fiind direct proporţional cu cantitatea de proteină prezentă.

Reactivi. 1. Soluţie de acid sulfosalicilic 3% în apă distilată. 2. Soluţie de NaCl 0,9% în apă distilată.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica. 1. Se face întîi o evidenţiere calitativă a proteinuriei prin proba cu acid sulfosalicilic. Dacă proteinele sînt în cantitate mai mare decît în „urme", se face o diluţie a urinei 1:20 cu soluţie de NaCl 0,9%. Se pregătesc apoi 2 eprubete în felul următor:

	Probă în alb	*Probă de analizat*
Urină (respectiv urină diluată)	1,0 *ml*	1,0 *ml*
Soluţie NaCl 0,9%	5,0 *ml*	—
Soluţie acid sulfosalicilic 3%	—	5,0 *ml*

Se agită şi se lasă 5 minute la temperatura camerei şi apoi se citeşte densitatea optică a probei faţă de proba în alb la 420 *nm* (filtru albastru). Pentru a obţine cantitatea de proteine (în *mg*/100 *ml*), se raportează extincţia citită la o curbă de etalonare care se prepară ca mai jos. Rezultatul se înmulţeşte cu diluţia urinei (în cazul nostru cu 20).

2. Tratarea curbei de etalonare. Se dozează proteinele dintr-un ser sanguin printr-una din metodele descrise la sînge. Se diluează apoi acest ser cu soluţia NaCl 0,9% astfel ca să obţinem o soluţie cu concentraţia 100 *mg* proteină/100 *ml*. Se pregătesc apoi eprubetele următoare (cantităţile sînt în *ml*):

Eprubeta nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
(*mg* proteină/100 *ml* urină)	—	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Apă distilată	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	—
Soluţie proteică	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Ac. sulfosalicilic 3%	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Se agită eprubetele şi după 5 minute se citesc extincţiile probelor 2-11 faţă de 1, la 420 *nm* (filtru albastru). Se reprezintă grafic extincţia în funcţie de cantitatea de proteine corespunzătoare (*mg* proteină/100 *ml* urină), aşa cum se indică în tabel.

3.1.2.3. | METODA BIURETULUI

Principiu. Proteinele urinare sînt precipitate cu acid percloric şi precipitatul este dizolvat în reactivul biuretului.

Reactivi. 1. Acid percloric 0,66 *N* (6,6%): se diluează 5,7 *ml* acid percloric 70% cu apă distilată la 100 *ml*. *2.* Reactivul biuretului (vezi dozarea proteinelor serice). *3.* Soluţie standard albumină.

Tehnica. 1. Precipitarea proteinelor. Se amestecă bine urina, dacă este tulbure se filtrează. Se pune într-o eprubetă de centrifugă 1 *ml* acid percloric, se răceşte la 0°, apoi se adaugă 1 *ml* de urină. Se aşteaptă 10 minute, apoi se centrifughează. Se aruncă supernatantul. Se notează eprubeta de centrifugă cu P (probă).

Scanned with OKEN Scanner

2. Se pregătesc 3 eprubete în felul următor:

Reactivi	*Probă*	*Standard*	*Martor*
Precipitat	+++	—	—
Apă distilată (*ml*)	—	—	0,02
Standard albumină (*ml*)	—	0,02	—
Reactiv biuret (*ml*)	1,0	1,0	1,0

Se agită, se lasă 30 min. şi apoi se citeşte extincţia la 540 *nm*, proba şi standardul faţă de martor, în cuvă de 1 *cm*.

Calcul. a. Cu ajutorul soluţiei standard:

$$g \text{ proteină/1000 } ml \text{ urină} = \frac{E_P}{E_S} \cdot \text{conc. standard } (g/1000\ ml) \cdot \frac{0{,}02}{1{,}00}$$

b. Cu ajutorul coeficientului de extincţie ($\varepsilon = 2{,}77$):

$$g \text{ proteină/1000 } ml \text{ urină} = \frac{E_P}{2{,}77 \cdot 1} \cdot \frac{1{,}02}{1{,}00} \cdot 10 = E_P \cdot 3{,}68.$$

c. Excreţia pe 24 ore: *g*/1000 *ml* · volumul urinei/24 *h*.

Valori normale:

Excreţia în mg/24 ore

	Bărbaţi	*Femei*
Ziua	23,9 (8,3 —44,5)	20,0 (9,1—31,6)
Noaptea	12,0 (3,6—21,1)	9,3 (4,2—14,4)
Total	35,9 (18,1—54,4)	29,3 (16,0—42,2)

Observaţii. 1. În cursul efortului fizic are loc o creştere a proteinuriei, care poate atinge de 5 ori valoarea normală.

2. Cantitatea de proteine eliminată variază în cursul zilei, de aceea trebuie să se facă analiza pe urina de 24 ore.

3. La copii se întîlnesc proteinurii ortostatice benigne, rare sub 10 ani, frecvenţa creşte între 14—16 ani, după care scade iar la valori foarte mici.

3.2. | Evidenţierea puroiului (piuria)

Se iau într-o eprubetă 5 *ml* urină, se adaugă cîteva picături hidroxid de sodiu 20%, se astupă eprubeta cu degetul şi se răstoarnă brusc readucîndu-se la poziţia iniţială. Apariţia unor bule de aer în lichid care rămîn mai mult timp în suspensie şi se ridică încet la suprafaţă denotă prezenţa puroiului.

Interpretare. Puroiul este constituit din leucocitele care au suferit o degenerescenţă granuloasă. Apare în urma proceselor inflamatorii

Scanned with OKEN Scanner

de origine microbiană. Certitudinea prezenței puroiului este dată de examenul microscopic. Astfel, urina normală recoltată din 24 ore prezintă 10—15 leucocite pe *mmc*. Apariția a 20—25 leucocite pe *mmc* poate fi considerată anormală, deși urina poate fi limpede. O piurie discretă dă 100—500 leucocite pe *mmc*, în cazul unei cistite ușoare 1000—5000 pe *mmc*, iar în cistitele acute, chiar 40.000. Urinele conținînd sub 200 leucocite pe *mmc*, pot să dea reacția negativă pentru proteine, la valori mai mari de obicei reacția este pozitivă.

3.3. | Glucidele urinare

Evidențierea uzuală a glucidelor urinare se face pe baza proprietății reducătoare a acestora față de sărurile unor metale (Cu, Bi) în soluții fierbinți. Pe lîngă glucide (glucoza, lactoza, fructoza, galactoza, pentozele), în urină se mai pot afla și alte substanțe reducătoare: glucuronidele, acid uric, urații, fenolii, acidul homogentizinic, acidul ascorbic, acidul saliciluric. De asemenea urina pacienților ce primesc doze mari de penicilină, streptomicină, oxitetraciclină, paraaminosulfone sau injecții intravenoase de polivinilpirolidonă și dextran poate reduce sărurile metalice.

Urina normală poate conține 1—1,5 g substanțe reducătoare pe 24 ore, din care o treime sînt glucide. În mod normal glucoza se află în urme, dar poate apare în cantități crescute după ingerarea unor cantități mari de glucide sau la persoanele cu glicozurie renală (1 din 300 cazuri de meliturie), un defect ereditar în reabsorbția glucozei în porțiunea proximală a tubilor renali. Cca 40% din gravide prezintă o meliturie în a doua jumătate a sarcinii, (lactozurie și destul de frecvent glicozurie).

Glicozuriile patologice sînt caracteristice pentru diabetul zaharat. Pentru reacțiile calitative se utilizează urina de la o singură emisie, iar pentru determinările cantitative urina din 24 ore, păstrată la rece, pe un conservant care nu interferează în reacție (se va evita utilizarea fenolului sau a cianurii de mercur). Probele de orientare se fac pe urina nedefecată, deoarece dacă proba este intens pozitivă defecarea devine inutilă. Dacă reacția este neconcludentă se lucrează pe urină defecată. Determinările cantitative se fac numai pe urină defecată.

Defecarea urinei

Operația se face cu scopul îndepărtării altor substanțe reducătoare din urină în afara glucidelor.

Reactivul Courtonne: 100 g acetat (neutru) de plumb și apă dis-

Scanned with OKEN Scanner

tilată ad 1000 *ml*; se adaugă acid acetic pînă la neutru (control cu hîrtie indicator) apoi se filtrează.

Tehnica. Se iau într-un cilindru 45 *ml* urină şi 5 *ml* reactiv Courtonne, se agită cu o baghetă, se lasă să se depună precipitatul şi se filtrează. Datorită diluării urinei cu reactiv Courtonne, la dozarea glucozei prin metoda Fehling apare în calcul factorul 1,1.

3.3.1. | EVIDENŢIEREA GLUCIDELOR URINARE

Există mai multe reacţii calitative care decelează substanţele reducătoare urinare. Actualmente se consideră că reacţiile Trommer şi Fehling nu sînt suficient de specifice pentru a fi utilizate pentru depistarea glicozuriei. Ceva mai specifice sînt reacţiile Nylander şi Benedict, ultima prezentînd avantajul de a da indicaţii aproximative asupra cantităţii de substanţe reducătoare din urină. Singura metodă specifică de evidenţiere a glucozei este metoda cu glucozooxidază (vezi testele rapide).

3.3.1.1. | REACŢIA TROMMER

Principiu. Hidroxidul cupric, format din reacţia dintre sulfatul de cupru şi alcalii, este redus în oxid cupros în prezenţa grupării carbonilice a glucidelor.

Reactivi. 1. Sulfat de cupru 10%. *2.* Hidroxid de sodiu sau potasiu 10%.

Tehnica. Se iau într-o eprubetă 2 *ml* $CuSO_4$ 10%, 2 *ml* NaOH 10% şi 5 *ml* urină. Se agită, se fierbe partea superioară a lichidului. Apariţia unui precipitat roşu-cărămiziu indică prezenţa substanţelor reducătoare.

3.3.1.2. | REACŢIA FEHLING

Principiu. Este similar cu cel expus anterior. Deoarece însă excesul de hidroxid cupric, neredus, se deshidratează la cald în oxid de cupru (negru), care deranjează reacţia, $Cu(OH)_2$ se complexează cu tartrat de sodiu şi potasiu.

Reactivi. *1.* Reactivul Fehling I: se dizolvă 35 g sulfat de cupru în apă, se adaugă 5 *ml* H_2SO_4 concentrat şi se completează cu apă la un litru.

2. Reactivul Fehling II: 150 g sare Seignette (tartrat de sodiu şi potasiu), 300 *ml* hidroxid de sodiu 30% şi apă distilată pînă la un litru.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica. Se iau într-o eprubetă 2 *ml* reactiv Fehling I, 2 *ml* reactiv Fehling II şi se fierb, pentru a controla reactivii, (nu trebuie să se schimbe culoarea albastră). Se adaugă apoi 5 *ml* urină şi se continuă fierberea. Apariţia unui precipitat roşu-cărămiziu indică prezenţa glucidelor urinare.

3.3.1.3. REACŢIA BENEDICT

Principiul este similar cu cel al reacţiei Fehling, dar pentru solvirea precipitatului de hidroxid cupric se utilizează citratul de sodiu.

Reactiv. Reactivul Benedict: se dizolvă 100 *g* carbonat de sodiu anhidru şi 173 *g* citrat de sodiu ($Na_3C_6H_5O_6 \cdot 2H_2O$) în cca 700 *ml* apă distilată. Se dizolvă 17,3 *g* sulfat de cupru ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) în cca 100 *ml* apă distilată şi se adaugă la soluţie de carbonat-citrat sub agitare constantă. Se aduce volumul soluţiei la un litru cu apă distilată.

Tehnica. Se pun într-o eprubetă 0,5 *ml* (10 picături) urină şi 5 *ml* reactiv Benedict. Se amestecă şi se pune într-o baie de apă la fierbere timp de 5 minute. Se lasă să se răcească la temperatura camerei; rezultatul se interpretează după tabelul următor:

Culoare	*Rezultatul*	*Substanţe reducătoare*
albastră	negativ	absente
albastru-verzui	urme	urme
verde	+	cca 0,5%
brun-verzui	++	cca 1,0%
galben	+++	cca 1,5%
roşu-cărămidă	++++	cca 2,0%

Reacţii fals pozitive pot da şi alte substanţe reducătoare (în special acidul ascorbic).

3.3.1.4. | REACŢIA NYLANDER

Principiu. Azotatul bazic de bismut formează prin reacţie cu alcaliile, hidroxid de bismut. Bismutul trivalent din hidroxid este redus de glucide la bismut metalic.

Reactivul Nylander se prepară prin dizolvarea a 2 *g* azotat bazic de bismut şi 4 *g* sare Seignette (tartrat dublu de sodiu şi potasiu) în 100 *ml* soluţie hidroxid de sodiu 10%. Reactivul este stabil.

Tehnica. Se adaugă într-o eprubetă la 5 *ml* urină, 1 *ml* reactiv Nylander şi se încălzeşte (la flacără) timp de 4 minute. În prezenţa glucozei apare un precipitat brun pînă la negru.

Ca sursă de eroare menţionăm că, în prezenţa unor cantităţi mari de proteine, poate apare un precipitat brun de sulfură de bismut.

Scanned with OKEN Scanner

3.3.1.5. (REACŢIA CU FENILHIDRAZINĂ). DIFERENŢIEREA GLUCOZEI DE LACTOZĂ URINARĂ

Principiu. Glucidele reducătoare dau la cald cu fenilhidrazina în exces o reacţie de condensare prin care se formează osazone. Acestea sînt specifice pentru glucidele neepimere şi identice pentru cele epimere (care diferă doar la atomul C_1 şi C_2), deoarece reacţionează grupările legate de atomii C_1 şi C_2 din molecula ozelor. Osazonele se deosebesc prin aspectul microscopic, solubilitate şi punct de topire.

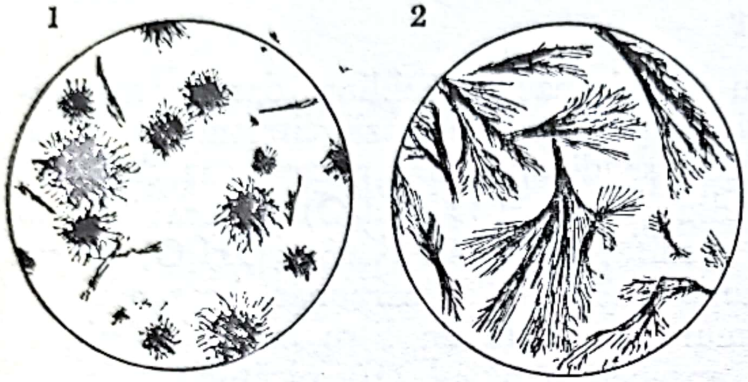


Fig. 54. 1, cristale de lactasazonă; 2, cristale de glucosazonă.

Reactivi. *1.* Cristale de clorhidrat de fenilhidrazină. *2.* Soluţie tampon de acid acetic-acetat de Na: se dizolvă 50 *g* acetat de Na în 20 *ml* acid acetic conc., şi se completează cu apă distilată la 100 *ml.*

Tehnica. Se iau într-o eprubetă 10 *ml* urină, se adaugă 1 *ml* tampon acid acetic-acetat de sodiu şi un vîrf de cuţit de clorhidrat de fenilhidrazină. Se lasă eprubeta în baia de apă (70—80°C) timp de o oră. Se răceşte eprubeta la curent de apă. Se iau cu o baghetă cîteva picături de soluţie cu precipitat, se pun pe o lamă de microscop, se acoperă cu o lamelă şi se examinează la microscop. Cristalele de glucosazonă se prezintă sub forma unor ace în mănunchiuri (snop), iar cele de lactosazonă sub forma unor gheme, uşor de diferenţiat (Fig. 54).

3.3.1.6. IDENTIFICAREA FRUCTOZEI URINARE (REACŢIA SELIVANOFF).

Principiu. În prezenţa acidului clorhidric, glucidele dau compuşi furfurolici, care prin condensare cu rezorcina formează coloranţi xantenici. Cetozele (în particular fructoza), dau o reacţie mai rapidă, în timp ce aldozele (glucoza) dau reacţia foarte încet.

Reactivi. Reactivul Selivanoff: 0,1 *g* rezorcină se dizolvă în 100 *ml* acid clorhidric diluat 1:1 cu apă distilată.

Tehnica. Se pun într-o eprubetă 0,5 *ml* urină şi 5 *ml* reactiv Selivanoff. În acelaşi timp se fac doi martori, unul cu 0,5 *ml* urină normală şi celălalt cu o urină normală în care s-a pus fructoză 0,1%. Se aduc la fierbere cele trei eprubete, după care se scot din flacără.

Scanned with OKEN Scanner

Prezența fructozei este indicată de o culoare roșie. Prin răcire se poate depune un precipitat roșu, care se dizolvă în alcool.

Interpretare. Fructozuria esențială este o boală ereditară rară (1:120.000) datorată blocării conversiei normale a fructozei în glucoză în ficat. Se poate produce o fructozurie alimentară în diabet și în boli hepatice.

3.3.1.7. | IDENTIFICAREA PENTOZELOR URINARE

a. Reacția Bial

Principiu. Sub acțiunea acizilor tari, pentozele formează furfurol, care, cu orcinol (metil-rezorcina), dă compuși coloraţi în verde, în timp ce oximetil-furfurolul, obținut din hexoze, nu dă această reacție.

Reactivul Bial. Se dizolvă 0,4 g orcinol în 200 *ml* acid clorhidric concentrat și se adaugă 0,5 *ml* soluție de clorură ferică 10%.

Tehnica. Se pun într-o eprubetă 5 *ml* reactiv Bial și 0,5 *ml* urină. Se fac în paralel doi martori, unul cu o urină normală și altul cu o urină normală în care se adaugă o soluție de pentoze 0,1% (arabinoză sau xiloză). Se aduc la fierbere cele trei eprubete, apoi se scot din flacără și se lasă să stea 5 minute — 20 minute. Pentozele dau o culoare verde, sau, dacă sînt prezente în cantități mari, un precipitat de culoare verzuie. Culoarea poate fi extrasă prin agitare cu alcool amilic.

Interpretare. Arabinoza și fructoza (hexoză) pot fi excretate de către persoanele normale după ingerarea unor cantități mari de fructe. Pentozuria esențială (în care se elimină xiluloza), este o boală ereditară rară (1: 50.000).

b. Identificarea xilulozei

Xiluloza prezintă proprietatea de a reduce soluția Benedict la o temperatură relativ joasă.

Tehnica. Se amestecă într-o eprubetă 1 *ml* urină cu 5 *ml* reactiv Benedict și se introduce eprubeta într-o baie de apă la 55°C timp de 10 minute. Apariția unui precipitat galben în aceste condiții este foarte sugestiv pentru xiluloză, deci pentru pentozuria esențială.

3.3.1.8. | IDENTIFICAREA GALACTOZEI

a. Proba osazonei

Se face reacția cu fenilhidrazină, folosind și un martor la care s-a adăugat galactoză în concentrație de 0,25—0,5%. După recristalizare din apă la fierbere, care se repetă de trei ori, se ia punctul de topire al galactosazonei (182°C). Procedeu și aspect microscopic la pag. 404.

Scanned with OKEN Scanner

b. Proba acidului mucic (pentru galactoză şi lactoză).

Principiu. Oxidarea galactozei cu acid azotic concentrat la cald, produce acid mucic, care precipită încet la răcire sub forma unor cristale caracteristice avînd punctul de topire 217—218°C.

Tehnica. La 50 *ml* urină se adaugă 12 *ml* acid azotic concentrat. Se face un martor cu o urină normală şi un martor cu o urină normală în care s-a adăugat galactoză în concentraţie de 0,5%. Se pun cele trei probe în baie de apă la fierbere şi se ţin pînă volumul scade la o treime sau mai puţin. Se răcesc şi se lasă să stea peste noapte. În cazul reacţiei pozitive, apare un precipitat fin de acid mucic, care se examinează la microscop în comparaţie cu probele martor.

Interpretare. Cantităţi mici de galactoză pot apare în ultima parte a sarcinii. Există însă o boală ereditară rară în care galactoza nu poate fi transformată în glucoză lipsind enzima fosfogalactozo-uridil-transferaza. Depistarea precoce a bolii la nou-născuţi previne apariţia retardării mentale şi a cirozei hepatice, deoarece prin excluderea laptelui din alimentaţie se poate asigura o dezvoltare normală.

Identificarea cromatografică a glucidelor urinare

Deoarece reacţiile calitative de identificare a glucidelor urinare sînt lipsite de sensibilitate (nu pot detecta sub 0,1% glucide), se poate face o identificare cromatografică, pentru care se dau numai indicaţiile bibliografice:

BIBLIOGRAFIE

1. Lynch, M. S., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., Inwood, M. J. H., *Medical laboratory technology and clinical pathology*, 2-nd E., W. B. Saunders Comp., Philadelphia—London—Toronto, 1969.

3.3.2. DOZAREA GLUCOZEI URINARE

3.3.2.1. METODA FEHLING

Principiu. Reacţia Fehling, al cărui principiu s-a prezentat la reacţiile calitative, poate servi şi pentru determinarea cantitativă a glucidelor reducătoare. În acest scop este necesar să se determine în primul rînd, corespondenţa în glucoză sau alt zahăr reducător al amestecului de reactiv Fehling I + II cu care se lucrează, cu alte cuvinte, să se stabilească titrul soluţiei Fehling. *Titrul soluţiei Fehling* este cantitatea de glucoză, exprimată în *mg*, care reduce amestecul format din 10 *ml* soluţie Fehling I + 10 *ml* soluţie Fehling II.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi. 1. Reactivii Fehling au fost descrişi la reacţiile calitative. *2.* Soluţie glucoză 1%: se cîntăreşte exact 1 *g* glucoză pură, uscată în prealabil la 100°C, şi se aduce într-un balon cotat de 100 *ml*, completîndu-se cu apă distilată la semn. *3.* Soluţie ferocianură de potasiu 5%.

Tehnica. 1) Determinarea titrului soluţiei Fehling: într-un pahar Erlenmayer se pipetează 10 *ml* reactiv Fehling I, 10 *ml* reactiv Fehling II şi 5 *ml* ferocianură de potasiu 5%. Se aduce la fierbere direct pe flacără sau pe o sită de asbest. În prealabil se pune într-o biuretă soluţia de glucoză 1% şi se lasă să picure în Erlenmayer soluţia de glucoză picătură cu picătură, după fiecare adăugare fierbîndu-se din nou. Titrarea se continuă pînă cînd soluţia devine galben aurie dispărînd nuanţa albastră. Dacă se depăşeşte acest punct de viraj adăugîndu-se prea multă soluţie de glucoză, apare o coloraţie brună închisă şi reacţia trebuie repetată.

Observaţii. 1. Este foarte important ca la început şi la sfîrşit lichidul din biuretă să se adauge numai cu picătura pentru a nu depăşi zona de viraj. *2.* Soluţia să fie în fierbere tot timpul. *3.* Reacţia să se facă rapid pentru a nu permite reoxidarea cuprului redus de glucoză. *4.* Se fac cel puţin trei probe paralele.

Calculul se face uşor ştiind că fiecare *ml* soluţie glucoză conţine 10 *mg* glucoză. Considerînd *N* numărul de *ml* glucoză 1% cu care s-a titrat din biuretă vom avea:

Titrul soluţiei Fehling $= N \cdot 10$ *mg*

2) Dozarea glucozei urinare

Se iau într-un Erlenmayer 10 *ml* Fehling I, 10 *ml* Fehling II şi 5 *ml* de ferocianură de potasiu 5% şi se aduc la fierbere. Într-o biuretă se pune urina defecată în prealabil şi se titrează soluţiile Fehling, după fiecare picătură adăugată aducînd la fierbere. Se continuă titrarea pînă în momentul cînd soluţia nu mai este albastră, ci galben aurie. Se notează cu *N* numărul de ml utilizaţi la titrare.

Calcul: $\text{g glucoză/litru} = \frac{\text{titrul Fehling}}{N} \times 1{,}1$ unde:

1,1 = diluarea urinei prin reactivul Courtonne

N = numărul de *ml* urină folosiţi la titrare.

Scanned with OKEN Scanner

Ţinînd seama că soluţiile Fehling furnizate de „Reactivul" Bucureşti, sînt mai concentrate decît cele clasice indicate la pag. 402; se indică utilizarea amestecului de 5 *ml* Fehling I + 5 *ml* Fehling II + 2,5 *ml* ferocianură de potasiu, atît pentru stabilirea titrului cît şi pentru determinarea glicozuriei.

3.3.2.2. METODA SUMNER

Principiu. Glucoza reduce la cald şi în mediu alcalin acidul dinitrosalicilic în acid 3-amino-5-nitrosalicilic de culoare roşie-portocalie. Intensitatea culorii este proporţională cu cantitatea de glucoză din soluţie.

Reactivi. 1. Soluţie de acid dinitrosalicilic: într-un vas de 2000 *ml* se pun 300 *ml* soluţie de NaOH 4,5%, 880 *ml* soluţie de acid dinitrosalicilic 1% în apă şi 225 *g* de tartart de Na şi K. Se amestecă pînă la dizolvare. Se păstrează în sticlă brună la întuneric, bine închisă. *2.* Soluţie standard glucoză (soluţia stoc): 1% în apă distilată. Pentru a se conserva, se face soluţia în acid benzoic 0,25%.

Tehnică. 1. Se determină aproximativ conţinutul de glucoză în urină prin reacţia Benedict. Dacă este peste 2%, se diluează urina 1:20. Dacă este sub 2%, se diluează 1:10.

2. Se diluează soluţia standard în aceeaşi proporţie ca şi urina. Se pregătesc apoi 3 eprubete gradate de 25 *ml:*

	Probă în alb	*Standard*	*Probă*
Urina diluată	—	—	1 *ml*
Sol. standard diluată	—	1 *ml*	—
Apă distilată	1 *ml*	—	—
Sol. acid dinitrosalicilic	3 *ml*	3 *ml*	3 *ml*

Se agită eprubetele şi se plasează în baie de apă la fierbere 5 minute, apoi se răcesc la robinet.

3. Se diluează fiecare probă la 25 *ml* cu apă distilată şi se amestecă. Se citesc extincţiile probei şi standardului faţă de proba în alb, la 525 *nm* (filtru verde).

$$\textit{Calcul. } g\% = \frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \cdot 1{,}0.$$

Observaţie. Dacă concentraţia glucozei este mai mare de 6%, se repetă dozarea cu o diluţie mai mare a urinei (1:30).

BIBLIOGRAFIE

Sumner, J. B., J. Biol. Chem, *62*, 287 (1924).

Scanned with OKEN Scanner

3.3.3. | DOZAREA FRUCTOZEI URINARE

Principiu şi reactivi. Vezi fructoza din plasmă şi ser.

Tehnica. 1. Deproteinizarea: 0,02 *ml* urină + 2,0 *ml* acid tricloracetic 0,61 *M*. Se lasă 5 minute în repaus, se centrifughează 10 minute la 3000 r.p.m.

$$\text{Diluţia} = \frac{VF}{VA} = \frac{2{,}02}{0{,}02} = 101$$

unde: VF = volumul final

VA = volumul urinei.

2. În trei eprubete pipetăm:

Reactivi	P	M	S
Reactiv antronă (*ml*)	1,0	1,0	1,0
Supernatant (*ml*)	0,1	—	—
Acid tricloracetic (*ml*)	—	0,1	—
Standard (*ml*)	—	—	0,1

Eprubetele se acoperă cu un refrigerent Ostrogovici şi se incubează 50 de minute la 37°C pe baia de apă. Se lasă apoi 15 minute în repaus (la temperatură ambiantă) şi se citeşte extincţia la 630 *nm* faţă de apă bidistilată. Coloraţia este stabilă cca trei ore.

Calcul:

$$mg/100\ ml\ \text{(urină)} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot C_S \cdot \frac{VF}{VA}$$

$$mg/100\ ml\ \text{(urină)} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot 5 \cdot \frac{2{,}02}{0{,}02} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot 505.$$

Observaţii. Vezi inulina (fructoza) din ser şi plasmă.

3.3.4. | DOZAREA GALACTOZEI URINARE

Principiu şi reactivi. Vezi dozarea galactozei din ser.

Tehnica. 1. Proba de urină trebuie diluată astfel încît să nu conţină mai mult de 500 µg galactoză pe *ml*, deci 100 µg/probă respectiv pe 0,2 *ml*. Diluţia se face cu apă bidistilată, conform tabelului:

Concentr. galactozei (*mg/ml*)	Diluţia (*ml*)	Factor de diluţie (*F*)
0,5	—	1
0,5 — 5,0	1 + 9	10
5,0 — 50,0	1 + 99	100
50,0	0,1 + 99,9	1000

Scanned with OKEN Scanner

2. Într-un tub de centrifugă de 10 *ml* se pipetează 1 *ml* acid percloric 0,33 *n* şi 0,2 *ml* urină diluată. Se amestecă bine. Se lasă 5 minute în repaus după care se centrifughează 10 minute la 3000 r.p.m. Supernatantul se transvazează într-o sticluţă uscată şi va servi mai departe pentru determinări.

Soluţia poate fi păstrată la frigider maximum 24 de ore.

3. Într-o cuvă spectrofotometru se pipetează următoarele:

tampon fosfat 0,2 *M*, *pH* = 7,5 (*ml*)	3,0
soluţie NAD^+ 13 *mM* (*ml*)	0,1
supernatant urinar (*ml*)	0,2

Se amestecă bine cu o baghetă din sticlă sau plastic. Se citeşte extincţia E_1 la spectrofotometru la 366, 340 sau 334 *nm* în cuva de 1 *cm*, temperatura de 20°—25°C. Se adaugă apoi 0,02 *ml* suspensie de galactodehidrogenază. Se amestecă bine. Se lasă 30—40 de minute în repaus pentru ca reacţia să aibă loc. Se citeşte din nou extincţia E_2, în aceleaşi condiţii. Diferenţa $E_2 - E_1 = \Delta E$.

Calcul. Cantitatea de galactoză se determină astfel:

$\Delta E_{366mn} \cdot 90{,}5 \cdot F = mg$ galactoză/100 *ml* probă (urină)
$\Delta E_{340mn} \cdot 48{,}0 \cdot F = mg$ galactoză/100 *ml* urină
$\Delta E_{334mn} \cdot 49{,}8 \cdot F = mg$ galactoză/100 *ml* urină

unde: F = factorul de diluţie
90,5 = o cifră calculată ţinînd cont de coeficientul molar de extincţie la 366 *nm*.

BIBLIOGRAFIE

1. Rommel, K., Klin. Wschr., *46*, (1968), 936. 2. Forsander, O A., Scand. J. Clin. Lab. Invest., *18*, suppl. 92 (1966), 143.

3.3.5. | DETERMINAREA PENTOZELOR (D-XILOZA) URINARE

Principiu. Prin încălzire 10 minute la 70°C în prezenţa reactivului care conţine acid acetic glacial, tiouree şi brom-anilină, pentozele urinare formează furfurol prin deshidratare. Acesta cu parabromanilina formează un produs colorat. Tioureea (din mediu) are rol de antioxidant.

Reactivi. Vezi determinarea din ser. 1. Soluţie de acid acetic glacial şi tiouree (soluţie saturată de tiouree în acid acetic glacial, circa 0,4 g%). 2. Reactiv para-bromanilină (se dizolvă 2 g parabromanilină în 10 *ml* reactiv 1). 3. Standard xiloză (0,5 g/100 *ml*): D-Xiloză 500 *mg* şi soluţie saturată la rece de acid benzoic pînă la 10 *ml*.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica. Urina clară este utilizată direct. Urina tulbure trebuie în prealabil filtrată. În trei eprubete se pipetează:

Reactivi	*Proba*	*Martor*	*Standard*
reactiv parabromanilină (*ml*)	5,0	5,0	5,0
urină (*ml*)	0,02	—	—
apă distilată (*ml*)	—	0,02	—
Standard xiloză (*ml*)	—	—	0,02

Se încălzeşte 10 minute pe baia de apă la 70°C. Se lasă în repaus la întuneric 60—120 de minute. La trei ore după încălzire, se citeşte extincţia la 546 *nm* faţă de apă.

Calcul:

a) Concentraţia:

$$g \text{ de pentoză/100 } ml \text{ urină} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot C_S = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot 0{,}5.$$

b) Excreţia absolută de xiloză:

$$mg \text{ de pentoză} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \cdot 5 \cdot \text{volumul urinei în } ml/24 \text{ ore.}$$

c) Excreţia în procente din cantitatea administrată:

$$\% \text{ xiloză excretată} = \frac{g \text{ xiloză excretată} \cdot 100}{\text{doza administrată în } g}.$$

BIBLIOGRAFIE

Richterich, R., Colombo, I. P., Ärtzl. Labor. 8 (1962), 33.

3.4. | Corpi cetonici urinari

Sub această denumire se cuprind acetona, acidul acetil-acetic şi acidul beta-hidroxibutiric. Ei apar în urină în diabetul netratat, febră, diaree şi vărsături, inaniţie, boli hepatice, cazuri în care metabolizarea glucozei este deficitară. Corpii cetonici sînt produşi intermediari din metabolismul lipidic. Se excretă în special acidul beta-hidroxibutiric şi acidul acetil-acetic, ultima substanţă fiind convertită în acetonă dacă urina este păstrată la temperatura camerei.

Scanned with OKEN Scanner

3.4.1. IDENTIFICAREA ACETONEI

3.4.1.1. REACŢIA LEGAL

Reactivi. 1. Soluţie nitroprusiat de Na 10% (proaspătă). *2.* Acid acetic glacial. *3.* NaOH 10% sau amoniac officinal.

Tehnica. Se iau într-o eprubetă cca 5 *ml* urină şi se adaugă 10 picături nitroprusiat de Na 10% şi se adaugă soluţie de NaOH pînă la reacţie alcalină. Apariţia unei culori, roşie sau portocalie, se datoreşte creatininei urinare. Se adaugă în continuare acid acetic. Dispariţia culorii indică absenţa acetonei, iar intensificarea culorii, cu virare spre roşu-violet, indică prezenţa acetonei. Sensibilitatea reacţiei este de 50—100 *mg* acetonă la litru şi este pozitivă şi cu acidul acetil-acetic.

Reacţia poate fi dată şi de unele medicamente (salicilaţi, aspirină etc.). Diferenţierea se face fierbînd în prealabil cîteva minute urina, operaţie prin care acetona se îndepărtează. O reacţie pozitivă iniţială care nu mai apare după fierberea unei alte probe de urină, indică prezenţa acetonei.

O variantă a reacţiei Legal este următoarea:

Reactivi. 1. Nitroprusiat de sodiu 1%: 1 *g* substanţă disolvată în 10 *ml* apă distilată, completat la 100 *ml* cu acid acetic glacial. *2.* Amoniac concentrat.

Tehnica. Se iau într-o eprubetă 5 *ml* urină şi se adaugă încet aproximativ 1 *ml* nitroprusiat de sodiu şi 1 *ml* amoniac. Apariţia unui disc violaceu la limita de separare a celor două faze, indică prezenţa corpilor cetonici, (acetona, acid acetil-acetic, acid beta-hidroxibutiric).

3.4.1.2. REACŢIA LIEBEN

Principiu. În reacţia dintre acetonă şi iod, în mediu alcalin, ia naştere iodoformul care poate fi recunoscut prin miros.

Reactivi. 1. Soluţie de iod 0,1 *n*. 2. Soluţie NaOH 10%.

$CH_3—CO—CH_3 + 3I_2 + 3KOH \rightleftharpoons CH_3—CO—CI_3 + 3KI + 3H_2O$
(triiodacetona)

$CH_3—CO—CI_3 + KOH \rightleftharpoons CH_3—COOK + CH\ I_3$ (iodoform)

Tehnica. Se iau într-o eprubetă 5 *ml* urină, se adaugă 1,5 *ml* NaOH 10% şi 1,5 *ml* iod 0,1 *n*. Apariţia unui precipitat galben şi a mirosului de iodoform indică prezenţa acetonei.

3.4.2. IDENTIFICAREA ACIDULUI ACETIL-ACETIC

Ca toţi beta-acizii, acidul acetil-acetic este puţin stabil transformîndu-se în acetonă şi CO_2. De aceea reacţia se face pe urină proaspătă. În diagnostic este suficientă identificarea acetonei, fiindcă acetona şi acidul acetil-acetic sînt întotdeauna prezenţi împreună.

Scanned with OKEN Scanner

Reacţia Gerhardt

Principiu. Se urmăreşte culoarea roşie formată cu $FeCl_3$.

Reactiv. Clorură ferică 10%.

Tehnică. La 10 *ml* urină, în prealabil defecată, se adaugă soluţie de clorură ferică, picătură cu picătură, pînă la redizolvarea precipitatului format iniţial (datorat fosfatului feric). În prezenţa acetonei apare o coloraţie roşu închis (bordo).

Reacţia este dată şi de salicilaţii şi antipirina, de aceea se vor face şi aici, dacă este cazul, probe duble, fierbînd în prealabil una din eprubete pentru îndepărtarea acidului acetil-acetic.

În general, identificarea acetonei şi separat a acidului acetil-acetic nu prezintă importanţă practică, deoarece reacţiile comune sînt mai sensibile. De asemenea, deşi la emisie acidul acetil-acetic predomină, datorită instabilităţii sale în mediu acid, este rapid transformat în acetonă şi CO_2.

3.4.3. | IDENTIFICAREA ACIDULUI BETA-HIDROXIBUTIRIC

În general, identificarea lui nu este necesară, fiindcă acetona şi aceto-acetatul sînt prezente în toate cazurile în care se elimină acidul beta-hidroxibutiric.

Principiu. Se îndepărtează în prealabil acetona şi acidul acetil-acetic prin fierberea urinei în mediu acid şi apoi se aplică reacţia Legal.

Tehnică. Se iau 10 *ml* urină, 10 *ml* apă distilată şi 5 picături acid acetic-glacial într-un pahar şi se fierbe sub nişă pînă la reducerea la jumătate a volumului. Se transvazează lichidul într-o eprubetă, se răceşte, apoi se adaugă 10 picături acid acetic concentrat, 10 picături soluţie de nitroprusiat şi se agită. Se adaugă apoi cu atenţie, pentru a nu se amesteca straturile, 2 *ml* amoniac 10%. În cazul prezenţei acidului beta-hidroxibutiric, apare un inel roşu-violet la nivelul de separare a lichidelor.

3.5. Acizii biliari

Eliminarea lor în urină (colalurie) apare în special în cazul de icter mecanic, cînd sărurile acizilor biliari nu mai sînt excretate în bilă. Trecînd în curentul sanguin, sînt eliminate în urină. Colaluria mai apare în icterele prin hepatită, cînd celula hepatică nu mai poate fixa acizii biliari.

Scanned with OKEN Scanner

3.5.1. | PROBA HAY

Principiu. Sărurile acizilor biliari scad tensiunea superficială a urinei, permiţînd sedimentarea floarei de sulf.

Reactiv. Sulf sublimat (floare de sulf).

Tehnica. Se presară floarea de sulf pe suprafaţa urinei pusă într-un vas cu diametru mare. Dacă urina conţine acizi biliari, sulful sedimentează în 5 minute. În absenţa acizilor biliari, sulful pluteşte cîteva ore.

3.5.2. | REACŢIA PETTENKOFFER

Principiu. Acizii biliari dau în prezenţa ozelor şi în mediu de acid sulfuric produşi coloraţi, datorită formării derivaţilor furfurolici din oze în mediu acid, care se condensează cu acizii biliari.

Reactivi. 1. Acid sulfuric conc. *2.* Zaharoză 10%.

Tehnica. Într-o eprubetă se iau 1 *ml* apă distilată, 1—2 *ml* urină, 5—6 picături zaharoză şi se agită. Se adaugă apoi cu grijă, pe marginea peretelui eprubetei 1—2 *ml* acid sulfuric. Apariţia unui inel roşu-violaceu indică prezenţa acizilor biliari. În paralel se face o probă martor în aceleaşi condiţii, înlocuind urina cu apă. Inelul obţinut are o nuanţă brună-cărămizie.

3.6. | Pigmenţii biliari

Pigmenţii biliari sînt derivaţi pirolici care provin din catabolismul hemoglobinei. Principalii reprezentanţi sînt: bilirubina, biliverdina, urobilinogenul, urobilina, stercobilinogenul, stercobilina.

3.6.1. | IDENTIFICAREA BILIRUBINEI

După cantitatea de bilirubină eliminată, culoarea urinei variază între galben-safran pînă la brun închis, cu nuanţă verzuie. Bilirubina eliminată prin urină este instabilă, de aceea reacţiile trebuie să se facă cît mai repede posibil după emisia urinei. Bilirubina fiind fotosensibilă, urina trebuie conservată la întuneric. Oxidarea bilirubinei poate fi împiedicată prin adausul unor substanţe reducătoare, ca acidul ascorbic; totuşi, o cantitate prea mare de acid ascorbic poate împiedica reacţiile de identificare.

Urina normală nu conţine decît urme de bilirubină, care nu dă reacţiile de identificare pozitive. Creşterea eliminării urinare a bilirubinei apare în icterele prin obstrucţia căilor biliare şi în icterele prin hepatită.

Scanned with OKEN Scanner

3.6.1.1. | REACȚIA TROUSSEAU

Reactiv: Se introduc într-un balon cotat de 1000 *ml*: 6,5 *g* I_2, 2,5 *g* KI, 6,4 *ml* apă și alcool ad 1000 *ml*.

Tehnica. Se pun cca 5 *ml* urină într-o eprubetă. Se adaugă cu precauție, cu o pipetă cca 2 *ml*, reactiv, astfel ca cele două lichide să nu se amestece. În prezența bilirubinei apare un inel verde la suprafața de contact dintre cele două faze.

3.6.1.2. | REACȚIA GMELIN

Principiu. Adăugarea acidului azotic concentrat la o soluție de bilirubină produce inele colorate la început în verde, apoi în albastru, violet, roșu-portocaliu, galben, datorită oxidării bilirubinei în biliverdină etc.

Reactiv. Acid azotic concentrat ($d = 1{,}14$).

Tehnica. Se pun cca 5 *ml* urină într-o eprubetă și se adaugă cu precauție 5 *ml* acid azotic, astfel ca cele două lichide să nu se amestece. În prezența bilirubinei se observă la suprafața de contact dintre lichide un inel verde, datorită biliverdinei produsă prin oxidarea bilirubinei. În continuare apar alte inele colorate în albastru, violet, roșu-portocaliu, galben.

Antipirina și fenotiazinele dau și ele un inel verde. Cantități mari de urobilină sau de indican pot împiedica formarea culorii verzi. Proba este puțin sensibilă.

3.6.1.3. | REACȚIA FOUCHET

Principiu. Reacția se bazează pe oxidarea bilirubinei în biliverdină.

Reactivi. 1. Soluție de acid acetic 3%. *2.* Soluție clorură de bariu 10%. *3.* Soluție saturată de sulfat de amoniu. *4.* Reactiv Fouchet: la 100 *ml* acid tricloracetic 25%, se adaugă 10 *ml* $FeCl_3$ 10%.

Tehnica. În cazul în care urina nu este ușor acidă, se va acidifica cu acid acetic. Se adaugă 5 *ml* clorură de bariu la 10 *ml* urină. Se agită și se filtrează reținîndu-se precipitatul, pe care se află adsorbită bilirubina (dacă nu s-a format precipitat se adaugă 1—2 picături de sulfat de amoniu). Hîrtia de filtru se depliază și se pune pe o altă hîrtie de filtru uscată și se adaugă peste precipitat o picătură reactiv Fouchet. Prezența bilirubinei este indicată de o pată verde.

Scanned with OKEN Scanner

3.6.2. | UROBILINOIZII URINARI

Sub acest nume se cuprind derivaţi hidrogenaţi ai bilirubinei: urobilinogenul, stercobilinogenul, urobilina şi stercobilina. Reducerea bilirubinei se produce în intestin sub influenţa bacteriilor. O parte din urobilinoizi este reabsorbită şi ajunge la ficat prin vena portă (circuitul enterohepatic al pigmenţilor biliari). Cea mai mare parte este metabolizată în timp ce 1—4 *mg* sînt excretate în urină.

Eliminarea urinară crescută apare în următoarele situaţii: 1) Hemoliză exagerată (funcţia hepatică este în general intactă, dar posibilităţile de metabolizare ale ficatului sînt depăşite): icter hemolitic; anemie pernicioasă, hipersplenism; 2) Tulburarea funcţiei hepatice: ictere hepato-celulare, hepatite, necroze hepatice, intoxicaţii cu cloroform şi tetraclorură de carbon, ciroză portală; 3) Ictere prin obstrucţie, doar în stadiile precoce, cînd obstrucţia nu este completă.

3.6.2.1. | UROBILINOGENUL ŞI STERCOBILINOGENUL (REACŢIA EHRLICH).

Principiu. În prezenţa p-dimetilaminobenzaldehidei în mediu puternic acid, bilinogenele dau o coloraţie roşie intensă, prin formarea unui compus chinoid.

Reactivi. 1. Reactiv Ehrlich: se dizolvă 2 g p-dimetilaminobenzaldehidă în 100 *ml* HCl 20%. 2. Cloroform.

Tehnica. Se pun într-o eprubetă 2—3 *ml* urină şi se adaugă 2—3 picături reactiv Ehrlich. Se lasă în repaus un minut. Apariţia unei coloraţii roşii intense la temperatura ambiantă (urina trebuie să fie rece!) indică o eliminare crescută de urobilinogen.

Surse de eroare. Porfobilinogenul dă o coloraţie asemănătoare, care nu este însă solubilă în cloroform sau în alcool amilic. Sulfamidele dau o coloraţie galbenă, care poate masca reacţia bilinogenelor. Dacă urina este caldă, indolul eliberat poate da culoarea roşie cu reactivul Ehrlich.

3.6.2.2. UROBILINĂ ŞI STERCOBILINĂ (REACŢIA SCHLESINGER—JAFFÉ).

Principiu. În mediu amoniacal bilinele formează cu acetatul sau clorura de zinc o sare de zinc caracterizată printr-o fluorescenţă verde.

Reactiv Schlesinger: 10 g acetat de zinc fin pulverizat, 100 *ml* etanol 95% şi 1—2 *ml* amoniac 10%.

Tehnica. Se amestecă în volume egale urina cu reactivul Schlesinger. Amestecul este filtrat. Apariţia unei fluorescenţe verzi a filtra-

Scanned with OKEN Scanner

tului (observată pe fond negru sau la lumină ultravioletă), indică prezența bilinelor.

Observație. Dacă se lasă amestecul în repaus cîteva ore, fluorescența crește prin oxidarea bilinogenelor în biline.

3.7. | Indicanul urinar

Triptofanul degradat în intestin de către colibacili este transformat în indoli și indoxil. Aceștia sînt reabsorbiți din intestin și sînt conjugați în ficat, indoxil-sulfatul (indicanul) fiind eliminat în urină. Excreția normală este 5—20 *mg*/24 ore.

Excreția este crescută în tulburările de absorbție consecutive unei digestii insuficiente a proteinelor și în cazul exagerării proceselor de putrefacție intestinală (enterite, achilie, insuficiență pancreatică, tulburări de tranzit intestinal).

3.7.1. | PROBA OBERMAYER

Principiu. Indoxilsulfatul este hidrolizat în mediu acid în indoxil care este oxidat prin ionii ferici în albastru de indigo. Colorantul format este solubil în cloroform.

Reactivi. 1. Cloroform. *2.* Soluție acetat de plumb 10%. *3.* Reactiv Obermayer: 1 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ și HCl concentrat ad 100 *ml*. Se prepară proaspăt.

Tehnica. Se iau într-o eprubetă 3 *ml* urină acidă și 3 *ml* acetat de plumb, se agită și apoi se filtrează. La un anumit volum din filtrat se adaugă o cantitate egală de reactiv Obermayer și 2—3 *ml* cloroform, apoi se agită cu precauție. După cantitatea de indican prezentă, cloroformul se colorează mai mult ori mai puțin în albastru. Dacă cantitatea este mică, colorația nu se produce decît după cîteva ore. Urina normală dă o colorație roză.

Observație. Iodura și bromura dau o colorație violetă, respectiv brună-galbenă. Dacă urina conține proteine se poate forma la o agitare puternică o suspensie greu de separat. Cantitățile mari de urobilină pot perturba proba; în acest caz se tratează extractul cloroformic cu KOH concentrat. Dacă apare un precipitat de clorură de plumb, se repetă proba cu mai puțin acetat de Pb.

Scanned with OKEN Scanner

3.8. | Sîngele, hemoglobina

În urină apare fie hemoglobina liberă (hemoglobinurie), fie hematii (hematurie). Diferenţierea se poate face numai prin examenul microscopic al sedimentului urinar.

Hematuria poate apare în boli ale căilor urinare, sau în boli hemoragice. Dacă cantitatea de sînge este mică, urina este roşie clară, iar dacă este mare, culoarea este roşie închisă. Uneori, cînd hemoglobina este transformată în methemoglobină (hemiglobină), urina este brună.

Hemoglobinuria apare în cazul unor procese hemolitice masive, în care hemoglobina nu poate fi transformată în pigmenţi biliari şi trece prin filtrul renal, fiind eliminată în urină. Distrugeri masive de hematii pot apare în: infecţii grave, intoxicaţii, arsuri grave, crize de malarie, marşuri forţate, anemii hemolitice, diferite forme de sifilis, enzimopatii eritrocitare. Urina este în general roşie sau roşie închis şi conţine, pe lîngă hemoglobină, proteine, oxalaţi de Ca şi adesea pigmenţi biliari.

Pentru decelarea sîngelui sau a hemoglobinei, urina trebuie să fie proaspătă fiindcă majoritatea testelor sînt bazate pe acţiunea pseudoperoxidazică a hemoglobinei: leucoderivatul unui colorant (benzidină, fenolftaleina redusă în mediul alcalin, guaiac etc.) este oxidat prin apă oxigenată, în prezenţa hemoglobinei, în colorantul respectiv. Deoarece leucocitele dau o reacţie peroxidazică adevărată (enzimatică), este necesar să se fiarbă urina cîteva minute, după acidularea prealabilă cu acid acetic.

3.8.1. | REACŢIA CU BENZIDINĂ

Reactivi. 1. Benzidina. *2.* Acid acetic glacial. *3.* Apă oxigenată 3%.

Tehnica. Se iau într-o eprubetă 2—3 *ml* acid acetic glacial şi un vîrf de cuţit benzidină, agitînd pentru dizolvare. Se adaugă apoi 3 *ml* apă oxigenată şi după agitare, 2 *ml* urină. Reacţia pozitivă prezintă o culoare albastră.

3.8.2. | REACŢIA THEVENON-ROLLAND

Tehnica. Se pun într-o eprubetă: 5 *ml* urină, 5 *ml.* alcool 90°, 0,25 *g* amidopirină (piramidon), 6—7 picături acid acetic pur şi se agită. Se adaugă apoi 6—7 picături apă oxigenată. În prezenţa sîngelui apare o coloraţie violetă în 2—3 minute. Procedeul este rapid însă nu este prea sensibil.

Scanned with OKEN Scanner

3.8.3. | PROBA PERLÈS

Principiu. Polivinilpirolidona (PVP) este o substanţă macromoleculară ce precipită cu acid tricloracetic. Precipitatul fixează hemoglobina (ori mai probabil hematina ce derivă din ea). Precipitatul separat este redizolvat în piridină şi cu această soluţie se practică proba de încercare. Metoda este foarte sensibilă.

Reactivi. 1. Soluţie de PVP, 25%. *2.* Acid tricloracetic 50%. *3.* Piridină pură incoloră. *4.* Apă oxigenată de 100—110 volume (30%). *5.* Reactivul guaiac-piridină: răşină de guaiac purificată, 10 *g* şi piridină pură incoloră, 100 *ml*. Răşina se obţine dizolvînd la cald o parte răşină din comerţ în 5 părţi alcool 95°. Se filtrează fierbînd. Soluţia este evaporată pe baie de apă într-o capsulă de porţelan şi rezidiul se menţine în etuvă la 100°C pînă dispare alcoolul. Se scurge răşina topită care se solidifică la răcire. *6.* Alcool — apă oxigenată: 0,1 *ml* apă oxigenată de 100—110 volume + alcool 95°, 100 *ml*. Se păstrează foarte bine.

Tehnica. Într-o eprubetă se pun 5—6 *ml* urină, 1 *ml* PVP 25%, se agită apoi se adaugă 2 *ml* acid tricloracetic 50%. Se formează un precipitat răşinos. Se introduce un agitator în eprubetă şi prin imprimarea unei mişcări circulare se scoate răşina pe agitator.

Se retrage apoi agitatorul, pe care se află fixat precipitatul, şi se spală cu jetul unei pisete într-un tub cu 3—4 *ml* piridină. Precipitatul se dizolvă, iar pe soluţie se fac două reacţii:

a) Reacţia cu amidopirină: se adaugă 0,20 *mg* amidopirină, se agită pentru dizolvare şi se adaugă 1 picătură (0,05 *ml*) H_2O_2 de 100—110 volume. Dacă există sînge, apare o culoare albastră-violetă aproape imediat, însă dispare rapid.

b) Reacţia cu guaiac: la soluţia de piridină se adaugă 0,1 *ml* reactiv de guaiac-piridină şi 5 *ml* alcool-apă oxigenată. Dacă există sînge, în cîteva minute apare o culoare albastră, stabilă timp de o oră.

3.9. | Identificarea mioglobinei (diferenţierea de hemoglobină)

La 1 *ml* urină se adaugă 3 *ml* soluţie de acid sulfosalicilic 3%, se agită, apoi se filtrează. Dacă pigmentul este precipitat şi rămîne pe hîrtia de filtru, în timp ce filtratul are culoarea urinei normale, pigmentul este de natură proteică. Dacă filtratul are culoare anormală, pigmentul este neproteic.

Dacă s-a stabilit natura proteică a pigmentului, se adaugă 2,8 *g* sulfat de amoniu solid la 5 *ml* urină, se amestecă bine pentru dizolvare şi se filtrează. Dacă pigmentul proteic este mioglobina nu va fi preci-

Scanned with OKEN Scanner

pitat prin săruri şi apare ca o culoare brun închisă în filtrat. Dacă este prezentă hemoglobina, ea precipită (prin aşa-numitul fenomen de "salting out") şi rămîne pe hîrtia de filtru. Se va utiliza urina proaspătă sau păstrată în frigider, la $pH = 7{,}0—7{,}5$.

BIBLIOGRAFIE

Blondheim, S. H., Margoliash, E., Shafrir, E., J.A.M.A., 167 (1958), 435.

3.10. | Porfirinele, porfobilinogenul, acidul delta-amino-levulinic

Copro- şi uroporfirinele sînt derivaţi octosubstituţi ai nucleului tetrapirolic al porfinei. Coproporfirinele au ca substituenţi grupe metil şi resturi de acid propionic, iar uroporfirinele au resturi de acid acetic şi de acid propionic. Există patru tipuri de izomeri posibili ai porfirinelor, dintre care prezintă importanţă biologică doar două, tipul I şi III, care se deosebesc numai prin poziţia resturilor propionic şi acetic (respectiv metil) la inelul IV. Din tipul III mai face parte şi protoporfirina, constituentul tetrapirolic al hemoglobinei.

Identificarea izomerilor I sau III ai porfirinelor necesită un laborator specializat. Se folosesc metode lungi şi delicate de separare prin cromatografie pe coloană şi pe hîrtie, identificarea finală făcîndu-se prin determinarea punctului de fuziune ale esterilor metilici.

De aceea se vor descrie doar metodele mai des folosite pentru determinarea copro- şi a uroporfirinelor, precum şi a unor intermediari din biogeneza lor (porfobilinogenul şi ac. delta-aminolevulinic) prin teste calitative şi dozări cantitative.

3.10.1. | PROBE CALITATIVE PENTRU EVIDENŢIEREA PORFIRINELOR

Recoltarea urinei pentru analiza porfirinelor se face într-un vas păstrat la întuneric ori învelit în hîrtie neagră, cu adaus de 5 g acetat de Na la urina din 24 ore.

Principiu. Soluţiile porfirinelor iradiate cu lumină ultravioletă prezintă o fluorescenţă roşie.

Materialul necesar. Lampă Wood: partea esenţială este filtrul Wood care este o sticlă opacă la lumina vizibilă. În lipsa lămpii Wood, se poate confecţiona un dispozitiv de examinare a fluorescenţei din-

Scanned with OKEN Scanner

tr-o cutie de carton 10 × 10 × 25 *cm* deschisă la unul din capete. În apropierea capătului opus se practică un orificiu lateral pe care se fixează filtrul Wood, iar deasupra la nivelul corespunzător se face orificiul pentru introducerea eprubetelor.

Reactivi. *1.* Soluţie apoasă saturată de acetat de sodiu. *2.* Soluţie HCl 5% în greutate (HCl conc. 42 *ml* şi apă distilată ad 1000 *ml*). *3.* Acid acetic cristalizabil. *4.* Eter etilic. *5.* HCl 0,5 *n.* *6.* $CaCl_2$ 3% în apă distilată (considerînd sarea anhidră). *7.* NaOH 0,1 *n.* *8.* NaOH *n.*

Tehnica. *1.* *Coproporfirine.* Într-o eprubetă se introduc 20 *ml* urină, 1 *ml* acid acetic şi 2 *ml* eter. Se amestecă prin răsturnare de 5—6 ori. Nu se agită pentru a evita emulsionarea. Se lasă în repaus şi se examinează cu lampa Wood (lumina ultravioletă). Proba este pozitivă dacă se observă o fluorescenţă roză sau roşie şi este negativă în absenţa fluorescenţei roşii ori în prezenţa unor coloraţii diverse.

2. *Uroporfirine.* Într-un balon de 250 *ml*, cu gît rodat, se introduc 10 *ml* urină, 10 *ml* HCl 0,5 *n* şi se fierbe cu refrigerent cu reflux 10 minute pentru a transforma porfobilinogenul în uroporfirină. Se răceşte şi se extrag coproporfirinele cu eter. Se pune reziduul apos într-o eprubetă şi se priveşte sub lampa Wood. Dacă se observă o fluorescenţă roză netă, proba este pozitivă. În caz contrar, uroporfirinele sînt absente sau fluorescenţa este inhibată de impurităţi.

Pentru purificare se adsorb porfirinele pe un precipitat de hidroxid de calciu. Se introduc într-o eprubetă 1 *ml* urină hidrolizată ca mai sus, 1 *ml* $CaCl_2$ 3% şi 3 *ml* NaOH *n.* Se agită, se centrifughează, se aruncă supernatantul, iar sedimentul se aduce în suspensie cu 5 *ml* NaOH 0,1 *n.* Se centrifughează iarăşi, se aruncă supernatantul. Se spală încă o dată sedimentul, aducîndu-se în suspensie cu 5 *ml* apă distilată. Se centrifughează şi se aruncă iarăşi supernatantul. Sedimentul se dizolvă în 10 *ml* HCl 0,5 *n* şi se examinează în lumina ultravioletă. În caz de fluorescenţă roză sau roşie proba este pozitivă. În lipsa fluorescenţei ori în prezenţa unor coloraţii diverse proba este negativă.

Observaţie. În mod normal, cantităţile infime de porfirine din urină nu sînt decelabile prin testele calitative. În cazul unei hematurii chiar discrete se va elibera protoporfirina prin hidroliza acidă a urinei şi se va obţine o fluorescenţă intensă. Se poate diferenţia uroporfirina de protoporfirină prin examinarea spectrului soluţiei. În cazul uroporfirinei se observă un maxim important la 405 *nm*, pe cînd la protoporfirină maximul este la 410 *nm*, iar la 405 *nm* se observă doar o mică denivelare. Dacă nu se dispune de un spectrofotometru, se va cerceta prezenţa sîngelui pe cale chimică.

Scanned with OKEN Scanner

3.10.2. DOZAREA SPECTROFOTOMETRICĂ A COPROPORFIRINEI ŞI A UROPORFIRINEI URINARE

Determinarea se bazează pe spectrul de absorbţie al porfirinelor, care prezintă benzi Soret foarte înguste (vezi partea generală), în regiunea 396—410 *nm*. Cunoscînd coeficienţii de absorbţie molară a fiecărei porfirine pentru o anumită lungime de undă se poate calcula concentraţia lor măsurînd extincţia la lungimea de undă respectivă. Deoarece în extractele de urină există şi alte substanţe care absorb în acest domeniu, extincţia va fi corectată prin măsurători la lungimi de undă la care absorb doar substanţele interferente.

Principiu. Coproporfirina şi alte coproporfirinogene sînt extrase mai întîi cu eter conţinînd acid acetic. Coproporfirinogenul este oxidat la porfirină cu iod diluat. Apoi coproporfirina totală este extrasă în HCl 5% şi determinată spectrofotometric. Uroporfirina este extrasă cu ciclohexanonă din reziduurile de la extracţia eterică a coproporfirinei prin ajustarea la *pH* 1,5. Din ciclohexanonă este extrasă în eter, din acesta în HCl 5% şi apoi determinată spectrofotometric.

Aparatură. Spectrofotometru, pîlnii de separare, cilindrii gradaţi, pipete.

Reactivi. 1. Acid acetic glacial. *2.* Eter de puritate anestezică, fără peroxizi; eterul mai puţin pur poate fi pus în sticle de culoare brună peste pulbere de sulfat feros cu care se agită din cînd în cînd. Înainte de întrebuinţare se spală de două ori cu apă distilată (de fiecare dată cu 1/6 din volumul său) după care se utilizează fără uscare. *3.* Ciclohexanonă: reactivul de grad tehnic se redistilă în vid pentru a obţine o fracţiune incoloră. *4.* Soluţie de acetat de Na diluată: 30 g de acetat de Na hidratat dizolvat în apă se aduce la 1000 *ml* şi se filtrează. *5.* Soluţie de iod 0,005%; se prepară proaspătă pentru fiecare zi, diluînd 1 *ml* din soluţia stoc de iod (1 g iod resublimat în 100 *ml* etanol absolut, la care se adaugă 100 *ml* apă; soluţia stoc este stabilă dacă se ţine la 4°C la întuneric). *6.* HCl 5%; 120 *ml* HCl conc. adus la 1000 *ml* cu apă distilată.

Tehnica. 1. Concentraţia porfirinei în urina proaspătă este întîi apreciată prin testul calitativ. Volumul luat în determinare se bazează pe această apreciere. Dintr-o urină normală aparent se iau 25 *ml*, dacă fluorescenţa este foarte intensă, se iau 2—5 *ml* urină diluată la 25 *ml* cu apă distilată. Proba este pipetată într-o pîlnie separatoare, se adaugă apă pînă la 25 *ml*, dacă este necesar şi 2,5 *ml* acid acetic glacial, apoi 50 *ml* eter. Amestecul este agitat puternic timp de un minut (de cca 200 ori) şi după separarea fazelor, cea inferioară (apoasă) este trecută în altă pîlnie de separare şi scuturată similar cu 50 *ml* eter. Acest extras eteric este combinat cu primul, iar faza apoasă fără co-

Scanned with OKEN Scanner

proporfirină (notată cu *U*) este reţinută pentru determinarea uroporfirinei. Extractele eterice combinate sînt spălate într-o pîlnie de separare prin scuturare timp de un minut în felul următor: *a*) Succesiv cu porţiuni de 20 *ml* acetat de Na pînă faza apoasă nu mai prezintă fluorescenţă roşie. În mod normal sînt suficiente două scuturări. Aceste soluţii de spălare sînt combinate, scuturate de două ori cu un volum egal de eter proaspăt timp de un minut, pentru a reextrage orice coproporfirină rămasă, eterul fiind adăugat la faza eterică, iar faza apoasă se adaugă la reziduul *U;* b) O dată cu soluţie de iod 0,005%; *c*) O dată cu 25 *ml* apă distilată.

2. Coproporfirina este acum extrasă prin agitarea soluţiei eterice cu porţiuni succesive de HCl 5% pînă extractul nu mai prezintă fluorescenţă roşie în lumina ultravioletă cînd este examinată într-un tub cu pereţi subţiri. Extractele se colectează într-un cilindru gradat, se amestecă şi se citeşte volumul total, în jur de 10 *ml*. Această soluţie este filtrată sau centrifugată şi apoi se măsoară extincţia într-o cuvă de 1 *cm* la 430 *nm*, 380 *nm* şi în maximul benzii Soret (cca 401 *nm*), iar coproporfirina se calculează după formula următoare:

$$[2\,D_{max} - (D_{430} + D_{380})] \cdot 837 \cdot \frac{v}{V} = ug \text{ coproporfirină/1000 } ml.$$

unde: V = volumul de urină luat în lucru, v = volumul extractului acid, D_{430} este densitatea optică la 430 *nm*, D_{380} este densitatea optică la 380 *nm*, iar D_{max} densitatea optică în maximul benzii Soret.

Normal, bărbaţi: 166 ± 45 *ug* coproporfirină/urină din 24 *h*.
femei: 134 ± 45 *ug* coproporfirină/urină din 24 *h*.

3. *Uroporfirina,* prezentă în U, reziduul urinar + soluţiile de spălare a fazei eterice, este recuperată prin adăugare de HCl conc. pînă la $pH = 1{,}5$ (măsurat cu *pH*-metrul). Se măsoară volumul V şi se agită 2 minute, nu prea puternic cu 2 porţiuni succesive de ciclohexanonă (fiecare în volum de $V/2$), permiţînd o separare bună a fazelor. La extractele de ciclohexanonă combinate se adaugă un volum (2 V) de eter şi se amestecă. Întîmplător se poate separa o cantitate mică de fază apoasă în acest stadiu, dar nu trebuie aruncată din pîlnie. Uroporfirina este extrasă prin scuturare cu volume succesive de cîte 1,5—2 *ml* HCl 5% pînă cînd extractul nu mai prezintă fluorescenţă roşie la lumina ultravioletă. Extractele sînt colectate într-un cilindru gradat, amestecate şi se citeşte volumul total (v). Această soluţie este filtrată sau centrifugată şi se măsoară extincţia la 430 *nm*, 380 *nm* şi maximul benzii Soret (cca 405 *nm*) şi conţinutul de uroporfirină se calculează după formula:

$$2\,D_{max} - (D_{430} + D_{380}) \cdot 832 \cdot \frac{v}{V} = \mu g \text{ uroporfirină/1000 } ml$$

Scanned with OKEN Scanner

unde: V = volumul de urină luat în lucru; v = volumul de extract acid, iar D sînt extincţiile la lungimile de undă respective.

Normal se elimină 5—30 μg uroporfirină/24 ore.

BIBLIOGRAFIE

Fernandez, A. A., Henry, R. J., Goldenberg, H., Clin. Chem., 1966, 12, 463.

3.10.3. EVIDENŢIEREA CALITATIVĂ A PORFOBILINOGENULUI (PBG)

Principiu. Porfobilinogenul dă o coloraţie roşie cu reactivul Erlich (p-dimetilaminobenzaldehidă în mediu clorhidric). Spre deosebire de culoarea dată de urobilinogen această culoare nu trece în cloroform. Reacţia a fost propusă în 1941 de Watson şi Schwartz ca test de diagnostic al porfiriei acute. Ulterior s-au descris şi reacţii fals pozitive date de cromogeni de natură insuficient cunoscută, care sînt extractibili cu butanol.

Reactivi. 1. Reactiv Ehrlich: p-dimetilaminobenzaldehidă pură 0,7 *g*, HCl conc. 150 *ml*, apă distilată 150 *ml*. *2.* Soluţie apoasă saturată de acetat de Na. *3.* Butanol. *4.* Cloroform.

Tehnica. Într-o eprubetă se introduc 2 *ml* urină, 2 *ml* reactiv Ehrlich, 4 *ml* soluţie saturată de acetat de sodiu şi 3 *ml* cloroform. Se agită energic. Dacă proba este pozitivă, derivatul roşu rămîne în faza apoasă, dacă coloraţia se datoreşte urobilinogenului, complexul colorat trece în cloroform.

În cazul reacţiei pozitive, se îndepărtează cloroformul, apoi se pipetează o cantitate mică din faza apoasă colorată într-o eprubetă şi se agită cu 1/2 din volumul său de butanol. Dacă derivatul roşu trece în butanol, reacţia este fals pozitivă.

Observaţii. 1. Reacţia este pozitivă în porfirie acută şi în uroporfirii. În coproporfirii în general este negativă. Reacţii fals pozitive s-au descris în carcinoame abdominale şi în epilepsie.

2. Se va efectua reacţia pe urină imediat după emisie fiindcă PBG se transformă în porfirine la lumină şi aer. Dacă nu se poate face examenul imediat, se alcalinizează urina la $pH = 7—8$ cu carbonat de natriu şi se păstrează urina la 0—4°C la întuneric.

3. Cele trei cromogene se deosebesc şi prin spectrul de absorbţie: urobilinogenul prezintă un singur maxim la 555 *nm*, PBG două maxime la 525 şi 555 *nm*, iar cromogenul responsabil de falsele reacţii are un maxim la 556 *nm* şi unul mai mic la 490 *nm*.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Townsend, J. D., Ann. Intern. Med. 60 (1964), 306.

3.10.4. | DOZAREA SPECTROFOTOMETRICĂ A PBG

Principiu. Se măsoară densitatea optică a compusului roşu format prin condensarea PBG cu p-dimetilaminobenzaldehidă în soluţie acidă (reactiv Ehrlich) la 552 *nm*.

Reactivi. 1. R. Ehrlich cantitativ: 5 *g* p-dimentilaminoazobenzaldehidă dizolvată în 125 *ml* HCl conc. se aduce cu apă distilată la 250 *ml*. *2.* Amestec acid pentru martor: 100 *ml* HCl conc. adus la 200 *ml* cu apă distilată.

Tehnica. Urina proaspătă este diluată cu apă distilată după efectuarea testului calitativ, pentru a aduce concentraţia de PBG în limitele 1—10 *µg/ml*. Se filtrează dacă este nevoie. Se măsoară cîte 2 *ml* de urină diluată în 2 eprubete: la una (martorul) se adaugă 2 *ml* reactiv 2, se amestecă şi se pune în cuva de 1 *ml* a spectrofotometrului. În cealaltă eprubetă se adaugă 2 *ml* reactiv Ehrlich, se amestecă şi se pune în cealaltă cuvă a spectrofotometrului, citind de repetate ori extincţia probei faţă de martor la 552 *nm* timp de 30—120 secunde, pînă se trece de maxim.

Calcul:

$$D_{max} \cdot \frac{V}{70{,}85} = mg \text{ PBG hidrat}/ml$$

unde: D_{max} = extincţia maximă înregistrată, iar V = factorul de diluţie $\frac{2}{\text{cantitatea de urină iniţială conţinută în 2 } ml}$.

Observaţii. 1. Deşi urina conţine substanţe care interferează, separarea PBG pe coloană cu schimbător de ioni, nu este necesară în porfiria acută, întrucît se excretă o cantitate mare de PBG (10—200 *mg*/24 *h*), iar interferenţa devine neglijabilă, datorită diluării mari a urinei. Culoarea apare rapid, însă dispare de asemenea rapid, de aceea se alege cea mai mare citire a extincţiei în calcul. La normali eliminarea de PBG nu depăşeşte 2 *mg*/24 ore.

3.10.5. | DOZAREA PBG ŞI ACIDULUI DELTA-AMINOLEVULINIC (DAL) DUPĂ MAUZERALL ŞI GRANICK

Principiu. Cei doi precursori ai porfirinelor se separă pe coloane cu răşină schimbătoare de ioni: anionică pentru PBG şi cationică pentru DAL. Eluatul coloanei anionice, care conţine PBG, se tratează cu reactiv Ehrlich şi se determină extincţia produsului format. Eluatul

coloanei cationice, care conţine DAL, se tratează întîi cu acetil-acetonă pentru transformarea DAL într-un pirol (2-metil, 3-acetil, (3-propionic) pirol) care acţionează cu reactivul Ehrlich formînd un produs colorat a cărui extincţie se măsoară.

Reactivi. 1. Soluţie acetat de sodiu *3M*: se dizolvă 408 *g* $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ în apă şi se completează la 1000 *ml*. 2. Soluţie acetat de Na *1M*. *3.* NaOH 1 *n*. *4.* HCl 1 *n* şi 2 *n*. *5.* Acid acetic *1M* şi 0,2*M*. Soluţia *1M* se prepară din 61 *ml* acid acetic glacial adus la 1000 *ml* cu apă distilată. *6.* Tampon acetat *pH* = 4,6: se dizolvă 136 *g* acetat de Na cristalizat în 700 *ml* apă; se adaugă 57 *ml* acid acetic glacial, se agită, se controlează *pH*-ul şi dacă este cazul se ajustează la 4,6, după care se completează cu apă la 1000 *ml*. *7.* Acetil-acetonă. *8.* Răşină anionică Dowex 2X8 granulaţie 200—400 mesh. Se utilizează sub formă de acetat. Pentru condiţionarea răşinii se pun 50—100 *g* răşină într-un pahar Berzelius mare şi se tratează cu 10 volume soluţie de acetat de Na *3M* amestecînd cu o baghetă. Se păstrează 24 ore amestecînd din cînd în cînd. După 24 ore se decantează cu grijă lichidul şi se repetă de trei ori tratarea cu acetat de Na *3M*. Se spală apoi în mod repetat cu cîte 10 volume de apă distilată, pînă ce apa de spălare nu mai reacţionează cu $AgNO_3$ (ionul clor a fost îndepărtat). Răşina astfel tratată se păstrează la frigider în 2—3 volume apă. Se poate folosi şi o răşină Amberlit I R — 410, care se condiţionează la fel. *9.* Răşină cationică Dowex 50X8, 200—400 mesh se utilizează sub formă H^+. Condiţionare: 50—100 *g* răşină se tratează cu 10 volume NaOH 1 *n* şi se lasă pînă a doua zi. Se decantează şi se spală cu cîte 10 volume apă, pînă ce apa de spălare rămîne neutră. Se tratează cu 10 volume HCl 2 *n*, se lasă 24 ore, apoi cu 10 volume HCl 1 *n*, lăsînd iarăşi 24 ore, după care se spală cu apă pînă la neutru. Se păstrează în frigider în 2—3 volume HCl 1 *n*, spălîndu-se cu apă înainte de utilizare. Reactiv Ehrlich *modificat:* 1 *g* p-dimetilaminobenzaldehidă se dizolvă în 30 *ml* acid acetic glacial, se adaugă 8 *ml* acid percloric 70% şi se completează cu acid acetic glacial la 50 *ml*. Reactivul trebuie să fie incolor sau slab gălbui. Se prepară proaspăt înainte de utilizare.

Pregătirea coloanelor. Se utilizează coloane de sticlă cu diametrul de 14—16 *mm* şi lungime de 120—150 *mm*. La fundul coloanei se pune puţină vată de sticlă şi un disc de hîrtie de filtru, apoi se adaugă suspensia de răşină pînă se formează un strat de 1,5—2 *cm* înălţime. Peste stratul de răşină se aşează un alt disc de hîrtie de filtru. Coloanele astfel pregătite se pot păstra cîteva zile, cu un strat de 5 *cm* apă peste răşină.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica. 1 *ml* din urina de cercetat cu $pH = 5—7$, (care poate fi păstrat la $pH = 4—6$, la temperatura 4°C, 20 de zile), se pune pe coloana anionic (Amberlit I R 410 sau Dowex 2—X8) şi se reglează curgerea la 1 pic/10 secunde. După trecerea urinei, coloana se spală cu 10 cm^3 de apă distilată. Porfobilinogenul rămîne adsorbit, iar DAL trece în lichidul de spălare. Prima fracţiune şi lichidul de spălare se trec cantitativ pe coloana cationică Dowex 50—X8 la care viteza de curgere în timpul trecerii soluţiei de mai sus este de 1 pic/10 secunde. După ce a curs toată soluţia, se spală coloana cu 10 *ml* de apă distilată; aici viteza curgerii este de 1 pic/5 secunde. Acidul delta amino levulinic (DAL) este absorbit pe coloana Dowex 60—X8 de unde se eluează cu 12 *ml* acetat de sodiu 1 *n* cu viteză de curgere 1 pic/10 secunde. Primii 3 *ml* se aruncă, iar restul se colectează în eprubete gradate (10 *ml*), se adaugă 0,2 *ml* acetil acetonă şi se completează pînă la 10 *ml* cu soluţie tampon de acetat. Soluţia se pune în baie fierbinte timp de 10 minute. După ce s-a răcit la temperatura camerei, la 2 *ml* din această soluţie se adaugă 2 *ml* reactiv Ehrlich modificat. (După preparare se mai poate folosi o zi).

Soluţia se trece în cuve de 1 *cm* şi după 10 minute se citeşte densitatea optică la lungimea de undă 550 *nm* faţă de proba în alb, care constă din 1 *ml* de apă distilată tratată la fel ca şi probele.

Curba de etalonare. Se prepară o soluţie de DAL care conţine pe *ml* 50 µg de substanţă etalon. Din această soluţie se trece peste Dowex 50—X8 cîte 1 *ml*, care se eluează cu acetat de sodiu aşa cum s-a arătat mai sus. Se adaugă la eluat 0,2 *ml* acetil acetonă şi se completează la 10 *ml* cu soluţie tampon acetat. Se pune 10 minute în baie de apă fierbinte. După răcire pînă la temperatura camerei, se iau porţiuni de: 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 *ml*. Fiecare porţiune se completează la 2 *ml* cu soluţie tampon acetat. Se realizează astfel concentraţii corespunzînd la 10, 20, 30, 40 şi respectiv 50 µg/*ml*. La fiecare eprubetă se adaugă 2 *ml* reactiv Ehrlich modificat (reactiv 10) şi după 15 minute se citeşte extincţia în cuve de 1 *cm* la 550 *nm*. Prin interpolare la curbă a extincţiei obţinute cu proba de urină se obţine concentraţia DAL în µg/*ml* urină.

Se calculează apoi excreţia pe 24 ore. La normali se excretă 2—4 µg/24 ore.

Dozarea porfobilinogenului (PBG). Aşa cum s-a arătat mai sus, PBG se adsoarbe pe coloana anionică (Dowex 2—X8 sau Amberlit I R—410). După spălare cu 10 *ml* apă distilată, se eluează PBG cu 5 *ml* acid acetic 1 *M* şi apoi cu 4 *ml* acid acetic 0,2 *M*. Se drenează lichidele complet. Eluatul se completează la 10 *ml* cu apă distilată. Se iau apoi 2 *ml* din această soluţie şi se amestecă cu 2 *ml* reactiv Ehrlich obişnuit (2 *g* dimentilaminobenzaldehidă în 100 *ml* HCl 20%).

Scanned with OKEN Scanner

După 5 minute se citeşte extincţia la 555 *nm* în cuve de 1 *cm* faţă de o probă în alb alcătuită din 2 *ml* apă distilată şi 2 *ml* reactiv Ehrlich.

$E_{555} \times 126 =$ *mg* PBG/1000 *ml* urină. Formula de calcul este stabilită pe baza coeficientului molar de extincţie a complexului colorat $\cdot \varepsilon = 3{,}6 \times 10^4$.

Observaţii. În cazul folosirii reactivului Ehrlich modificat (reactiv 10), coloraţia este mai intensă ($\varepsilon = 6{,}1 \times 10^4$), iar factorul cu care se va înmulţi extincţia va fi corespunzător mai mic (74,4 în loc de 126). În astfel de condiţii citirea se va face după 15 minute.

BIBLIOGRAFIE

Mauzerall, D., Granick, S., J. Biol. Chem., 219 (1956), 435. Nesterenko, M. T., Virovec, O. A., Laboratornoe delo., 21, (1964), 195.

3.10.6. METODA SIMPLIFICATĂ DE DOZARE A ACIDULUI DELTA-AMINOLEVULINIC (DAL) DIN URINĂ

Principiu. Acidul ϑ-aminolevulinic din urina diluată este condensat cu acetil acetonă, iar pirolul format dă împreună cu reactivul Ehrlich un complex colorat a cărui extincţie se citeşte la 553 *nm*.

Reactivi. 1) Acetat de sodiu 0,5 *N*. *2*) Soluţia de diluare. Se amestecă 100 *ml* acetat de sodiu 0,5 *N* cu 0,25 *g* cărbune activ. *3*) Acetilacetonă. *4*) Reactiv Ehrlich modificat (vezi metoda precedentă). *5*) Soluţia standard DAL conţinînd 50 µg/*ml*.

Tehnica. Se amestecă 1 *ml* urină cu 9 *ml* soluţie de diluare (reactiv 2) şi se agită bine. Se filtrează printr-o hîrtie de filtru cantitativă (de ex. MN 214). Se scot cîte 2 *ml* din filtrat în două eprubete diferite (probă şi martor). În probă se adaugă 0,1 *ml* acetilacetonă, iar la martor se adaugă 0,1 *ml* acetat de sodiu 0,5 *N*. Se fierb 20 *min*, iar după răcire se adaugă, în ambele eprubete, cîte 2 *ml* reactiv Ehrlich modificat. După 15 minute se citeşte fiecare probă faţă de martorul propriu la 553 *nm* în cuva de 1 *cm*. Extincţiile se interpolează la o curbă etalon. Pentru prepararea curbei se efectuează diluţii din soluţia standard obţinîndu-se concentraţii de 5, 10, 20, 30, 40 şi 50 µg/*ml*, iar un mililitru din aceste diluţii se tratează în acelaşi mod ca şi probele (diluare, filtrare etc.). Din curbă se obţin valorile în µg/*ml* (*mg*/litru), putîndu-se calcula apoi eliminarea de DAL pe 24 ore şi care la normal este de 1,5—4 *mg*.

Scanned with OKEN Scanner

Observaţii. În lipsa unui standard de acid δ-aminolevulinic se poate folosi formula

$$mg\ \text{DAL/litru} = \frac{E - 0{,}0205}{0{,}0153} \times 0{,}78$$

Această metodă nu poate fi folosită în caz de porfirie acută, cînd se elimină prin urină atît DAL, cît şi porfobilinogen (PBG). În schimb, în caz de saturnism, eliminările de PBG sînt reduse, iar cele de DAL mult crescute (10—100 ×) astfel încît metoda este extrem de utilă pentru depistarea intoxicaţiilor cu plumb.

BIBLIOGRAFIE

Benkő, G., Darkó, I., Orvosi Hetilap., II (1971), Nr. 51, p. 3085.

3.11. Identificarea melaninei

3.11.1. TESTE DE ORIENTARE (SCREENING)

a) Se lasă urina expusă la aer timp de 24 ore. Dacă există melanogen acesta va fi oxidat în melanină şi urina se va colora brun închis ori negru, începînd de la suprafaţă. Acidul hemogentizinic produce acelaşi efect, dar în acest caz, închiderea la culoare este accelerată de alcalii, pe cînd transformarea melanogenului în melanină nu este influenţată de alcalinizare.

b) La 5 *ml* urină se adaugă 1 *ml* soluţie de clorură ferică 10% în HCl 10%. Dacă este prezent melanogenul, urina devine brună ori neagră.

3.11.2. TESTUL THORMAHLEN

Se prepară o soluţie proaspătă de nitroprusiat de sodiu, prin agitarea cîtorva cristale în 10 *ml* apă distilată. La 5 *ml* urină proaspătă se adaugă 0,2 *ml* soluţie de nitroprusiat şi 0,5 *ml* NaOH 40%. Se agită bine, apoi se adaugă 3—5 *ml* acid acetic 33% şi se agită iarăşi. Culoarea verde închisă ori albastră indică prezenţa melanogenului. Urina normală trebuie folosită ca martor, putînd da uneori o culoare verzuie slabă.

3.11.3. TESTUL BLACKBERG ŞI WANGER

Se evaporă urina din 24 ore la un sfert din volumul iniţial. Se adaugă 1 g persulfat de potasiu pentru fiecare 100 *ml* de concentrat. Se amestecă şi se lasă două ore, se adaugă apoi un volum egal de alcool

Scanned with OKEN Scanner

metilic şi se amestecă. Se lasă precipitatul să se depună, apoi se filtrează. Se spală precipitatul pe filtru cu apă distilată pînă filtratul este incolor. Se spală apoi cu alcool metilic şi în final cu eter. Dacă rămîne pe filtru precipitat brun sau negru solubil în NaOH 5%, probabil că este datorită melaninei.

Interpretare. Melanuria apare în cazurile de melanosarcoame cu metastaze hepatice sau în alte organe.

BIBLIOGRAFIE

Harrison, G. A., *Chemical Methods in Clinical Medicine,* Ed. J. and. A. Churchill, London, 1947.

3.12. Acidul fenilpiruvic

3.12.1. REACŢIA CU CLORURĂ FERICĂ

Principiu. Acidul fenilpiruvic dă cu sărurile ferice în mediu acid o culoare verde. Reacţia nu este specifică deoarece ionii ferici formează cu hidroxiacizii aromatici complexe a căror stabilitate şi culoare depinde de poziţia respectivă a funcţiilor —OH şi —COOH.

Reactivi. 1. Clorură ferică 10%. *2.* HCl 1 *n.*

Tehnica. Se acidifică cca 5 *ml* urină proaspătă cu cîteva picături de HCl 1 *n.* Se adaugă clorura ferică picătură cu picătură. În cazul prezenţei acidului fenilpiruvic şi p-hidroxifenilpiruvic, apare o coloraţie verde instabilă.

La sugari se poate pune o picătură de clorură ferică pe scutecul copilului îmbibat cu urină. Dacă culoarea brună trece în verde, reacţia este pozitivă.

Interpretare. Reacţia este pozitivă în cazul fenilcetonuriei, o aminoacidopatie gravă care duce la retardare mintală. Depistarea bolii la nou-născuţi permite salvarea copiilor prin tratament dietetic (excluderea aminoacizilor aromatici).

Reacţia nu este specifică pentru acidul fenilpiruvic. În reacţie interferează medicamentele de tipul fenotiazinei.

3.12.2. DOZAREA ACIDULUI FENILPIRUVIC

Principiu. Acidul fenilpiruvic este separat de levomepromazină (şi alte amine derivate de la fenotiazină) cu ajutorul unei extracţii cu eter în mediu acid. Aminele rămîn ca solvite în faza apoasă, pe cînd acidul fenilpiruvic este extras din eter cu o soluţie de NaOH. După acidificare, se dozează acidul fenilpiruvic.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi. *1.* Soluţia apoasă de clorură ferică 5%. *2.* Eter lipsit de peroxizi, care pot da erori însemnate. *3.* Soluţie apoasă de fenilpiruvat de Na 10‰. *4.* HCl pur. *5.* HCl *n*. *6.* NaOH *n*. *7.* Soluţie alcoolică de fenolftaleină 2%.

Tehnica. Se ajustează urina la *pH* 6 şi se filtrează. În patru pîlnii de separare se pun cîte 10 *ml* urină filtrată şi 5 *ml* HCl pur. În pîlniile 2, 3 şi 4 se adaugă respectiv: 0,1; 0,2 şi 0,3 soluţie fenilpiruvat de Na. Se toarnă 15 *ml* eter, se agită 3 minute, apoi se lasă în repaus. Se pune faza apoasă în alte pîlnii şi se repetă extracţia. Se îndepărtează faza apoasă şi se reunesc cele două extracte eterice. Se spală de trei ori cu cîţiva *ml* de HCl *n*, care se îndepărtează. Se spală de două ori straturile eterice cu 10 *ml* NaOH *n* şi a treia oară cu 5 *ml*. De fiecare dată se agită 2 minute, se lasă să se decanteze, apoi se colectează cele trei faze într-un balon cotat de 50 *ml* ce conţine 24 *ml* HCl *n* şi o picătură soluţie fenolftaleină. Se mai adaugă, dacă este nevoie, cîteva picături de HCl *n* şi o picătură de fenolftaleină şi se aduce la semn cu apă distilată. Se mai face o probă în alb cu 25 *ml* HCl *n*, 25 *ml* NaOH *n* şi o picătură soluţie fenolftaleină. Cele 5 baloane conţin următoarele cantităţi de acid fenilpiruvic: X *mg*/litru, (X + 100) *mg*/litru, (X + 200) *mg*/litru, (X + 300) *mg*/litru şi 0 *mg*/litru.

Operaţiile trebuie să se facă continuu şi cît mai rapid posibil. acidul fenilpiruvic fiind instabil. Se pregătesc apoi şapte eprubete în felul următor:

Nr. eprubetei	1	2	3	4	5	6	7
prelevat din balonul cotat	(nr. 1)	(nr. 5)	(nr. 5)	(nr. 1)	(nr. 2)	(nr. 3)	(nr. 4)
(*ml*)	5	5	5	5	5	5	5
apă distilată (*ml*)	5,3	5	5,3	5	5	5	5
sol. clorură ferică	0	0,3	0	0,3	0,3	0,3	0,3

Se agită pentru amestecare şi apare culoarea verde. Exact la 2 minute după adăugarea percloruri de Fe se citeşte la 640 *nm* (filtru roşu) densitatea optică în cuvă de 1 *cm*. Se notează densităţile optice corespunzătoare celor 7 eprubete în felul următor: A_1, A_2, A_3, D_1, D_2, D_3 şi D_4. Variaţia medie a densităţii optice produsă de 1 *mg* acid fenilpiruvic/litru este:

$$D = \frac{(D_4 - D_3) + (D_3 - D_2) + (D_2 - D_1)}{300}$$

iar cantitatea de acid fenilpiruvic este dată de formula:

$$\text{miligrame/litru} = \frac{D_1 - A}{D}, \text{ unde } A = A_1 + A_2 - A_3.$$

Observaţii. Pierderile în cursul manipulărilor sînt de 8—15%.

Scanned with OKEN Scanner

3.13. | Identificarea acidului homogentizinic

Se bazează pe mai multe probe:

a) Urina se colorează în brun prin ședere, începînd cu stratul de la suprafață. Spre deosebire de cazul melanogenului, acest proces este accelerat de alcalii.

b) Acidul homogentizinic reduce soluțiile alcaline de săruri de cupru suferind concomitent o polimerizare oxidativă. Rezultă un precipitat galben-portocaliu într-un supernatant brun-murdar.

c) În reacția cu clorura ferică se obține o culoare albastră-verde ori violet.

d) Se amestecă urina cu o soluție de azotat de argint 5% în volume egale. Se formează un precipitat care în cîteva minute se înnegrește. Procesul este accelerat de 1—2 picături de soluția concentrată de amoniac.

Pentru a evita confuziile, redăm *culorile care pot apare la reacția cu clorură ferică:*

Culoarea verde care apare imediat, instabilă: a. fenilpiruvic, histidină sau tirozină, hidrochinonă.

Culoare albastră sau verde ce dispare rapid: acid homogentizinic (se vor face alte probe); acid fenilpiruvic (nu reduce reactivul Fehling ori Benedict).

Culoare roșie sau roșie-brună: acid acetil acetic (se fac reacțiile pentru corpii cetonici).

Culoare verde sau albastră-verde: acid imidazolpiruvic (în histidinemie).

Culoare albastră-verde: bilirubină în exces.

Precipitat gri ce se înnegrește: melanină.

Culoare roșie purpurie persistentă: produși de excreție ai salicilaților.

Culoare violetă: substanțe fenolice (ingerare de fenoli).

Culoare gri pînă la verde: ingerare de medicamente de tip fenotiazinic.

Culoare verde stabilă: fenol, pirocatechină, adrenalină.

3.14. | Identificarea și dozarea acidului 5-hidroxi-indolacetic (5 HIAA)

Acidul 5 hidroxi-indolacetic este produsul de excreție al 5-hidroxitriptaminei (serotoninei) și rezultă în organism prin decarboxilarea acesteia. Serotonina este o amină biologică cu efecte vasoconstrictive fiind produsă în celulele argentafine ale tractului digestiv și în plăcu-

Scanned with OKEN Scanner

țele sanguine. Producerea în exces a serotoninei în caz de tumori „carcinoide" ale celulelor argentafine se însoțește de eliminarea unor cantități patologice de 5 HIAA prin urină.

3.14.1. | TEST CALITATIV DE IDENTIFICARE

Se amestecă 3 *ml* urină cu 3 *ml* reactiv Ehrlich (vezi „Identificarea urobilinogenului", pag. 416). Se încălzește la fierbere pe baia de apă. Apariția unei colorații albastre denotă prezența unei excreții anormale de 5 HIAA.

3.14.2. DETERMINAREA CANTITATIVĂ

Principiu. 5 HIAA formează cu alfa-nitrozo-beta-naftolul și acidul azotos un diazoderivat a cărui densitate optică se măsoară la 540 *nm.*

Reactivi: 1) alfa-nitrozo-beta-naftol (1-nitrozo-2-naftol) 1% în alcool etilic 95%. *2*) Acid azotos. Se amestecă 0,2 *ml* nitrit de sodiu 2,5% cu 5 *ml* acid sulfuric 2 *N*. Se prepară proaspăt înainte de utilizare. *3*) Dicloretan (clorură de etilen, etilen-diclor). *4*) Standard de 5 HIAA. Se dizolvă 8 *mg* acid 5-hidroxiindolacetic în apă distilată și se aduce volumul la 100 *ml* cu apă distilată (5-HIAA pur se poate obține de la Mann Research. Lab. New-York).

Tehnica. În trei eprubete cu dop rodat se pipetează 0,2 *ml* urină (proba), 0,2 *ml* apă distilată (proba în alb) și 0,2 *ml* soluție standard 5-HIAA (standard). Se adaugă în fiecare din cele trei eprubete 0,8 *ml* apă distilată și 0,5 *ml* reactiv alfa-nitrozo-beta-naftol și se amestecă. Se adaugă în continuare cîte 0,5 *ml* reactiv acid azotos proaspăt preparat, se amestecă și se lasă să stea 10 minute. Se pipetează apoi în fiecare eprubetă 5 *ml* dicloretan, se agită 15 secunde și se centrifughează 10 minute la 2800 rotații pe minut. Se transferă stratul superior de dicloretan în cuvele spectrofotometrului și se citesc extincțiile din probă și standard față de proba în alb la 540 *nm.*

Calcul.

$$\frac{E \text{ probă}}{E \text{ standard}} \times 8 = mg \text{ 5-HIAA/100 } ml \text{ urină.}$$

Rezultatul se va raporta la urina colectată pe 24 ore.

Valori normale: 2—9 *mg*/24 ore.

Creșteri patologice (pînă la 100—220 *mg*/24 ore) se întîlnesc în cazurile de tumori carcinoide cu metastaze hepatice.

Scanned with OKEN Scanner

Observaţii. În cazuri dubioase este recomandabil să se colecteze urina imediat după o criză de înroşire a tegumentelor sau după colici abdominale.

Medicamentele de tipul fenotiazinei pot masca prezenţa de 5-HIAA (reacţii fals negative), iar ingestia de banane şi acetanilidă pot provoca reacţii fals pozitive. Consumul acestor medicamente sau al bananelor se va opri, deci, cu cel puţin 72 ore înainte de colectarea urinei.

BIBLIOGRAFIE

Sjoerdsma, A., Weissbach, H., Udenfriend, S., J.A.M.A., 159, 1955, 397.

3.15. | Identificarea bromurilor

Principiu. Bromurile în prezenţa bromatului de potasiu, în mediu acid eliberează bromul, care poate fi extras şi concentrat cu un solvent organic nemiscibil, în care dă o culoare portocalie sau roşie. Reacţia depistează minimum 40 *mg* bromuri/100 *ml* urină, ceea ce corespunde la 80 *mg* bromuri/100 *ml* ser. Iodul dă o culoare violetă în aceleaşi condiţii.

Reactivul se prepară chiar înainte de utilizare. Se dizolvă 2 g bromat de K în 10 *ml* apă distilată încălzită la 60°C. Se lasă la temperatura camerei pînă se răceşte. Se agită bine, se filtrează excesul de sare. Soluţia saturată se amestecă cu acid sulfuric 20% în proporţie 1:2.

Tehnica. Se amestecă 0,5 *ml* reactiv cu 3 *ml* urină. Se lasă să stea trei minute. Se adaugă 0,5 *ml* cloroform sau toluen, se închide cu un dop şi se agită. Se lasă să stea pînă separarea este completă (cca 2 minute). Reacţia este pozitivă dacă în solvent apare o reacţie portocalie sau roşie.

Interpretare. O reacţie pozitivă asociată cu o scădere marcată a clorului seric (ca rezultat al înlocuirii ionului de Cl^- cu cel Br^-) se întîlneşte în intoxicaţiile cu brom.

3.16. | Teste rapide pentru evidenţierea compuşilor patologici urinari.

În ultima vreme s-au pus la punct o serie de teste rapide pentru decelarea şi estimarea semicantitativă a compuşilor patologici urinari. *Acestea* sînt fabricate sub formă de comprimate, baghete de celuloză

Scanned with OKEN Scanner

sau benzi de hîrtie de filtru impregnate cu reactivi, care fiind puse în contact cu urina, se colorează sau colorează proba de urină, iar culoarea este comparată cu o scară pentru aprecierea semicantitativă.

Astfel pentru evidenţierea glucidelor există comprimate care sînt un fel de reactiv Benedict prezentat sub această formă: „Clinitest". Există însă şi teste pentru evidenţierea specifică a glucozei, sub formă de hîrtie de filtru, bazate pe reacţia glucozoxidazei (ca la dozarea glicemiei): „Clinistix", „Tes-Tape", etc. În cazul prezenţei glucozei, hîrtia se colorează în albastru, intensitatea culorii fiind proporţională cu concentraţia glucozei.

Pentru depistarea proteinuriei există probe mai specifice decît reacţiile de precipitare, cum sînt cele cu „Albustix". Testul se bazează pe faptul că proteinele modifică culoarea indicatorilor la un anumit *pH*, modificare proporţională cu concentraţia proteinelor. Astfel în cazul „Albustix"-ului o baghetă de celuloză este impregnată cu albastru de tetrabromfenol adus la *pH* 3 cu tampon citrat. Introducerea într-o soluţie de proteină produce virarea culorii de la galben spre albastru-verde.

Corpii cetonici se pot evidenţia cu tablete („Acetotest") sau baghete („Ketostix") care conţin nitroprusiat de sodiu, glicocol şi fosfat disodic, care se colorează în roşu în cazul reacţiei pozitive.

Depistarea fenilcetonuriei se poate face cu baghete de celuloză impregnate cu sulfat dublu de Fe (III) şi amoniu, sulfat de amoniu şi acid ciclohexil sulfamidic: „Phenistix". În cazul reacţiei pozitive, bagheta se colorează în gri pînă la gri-albastru. Testul este mai sensibil şi mai specific decît reacţia cu clorură ferică.

Bilirubina se poate evidenţia cu ajutorul unor comprimate („Ictotest"), prin formarea unui azocolorant.

Decelarea sîngelui se poate face prin reacţia peroxidazică, cu ajutorul unor comprimate („Oculttest") sau baghete („Hemastix").

4. DOZAREA PRINCIPALELOR SUBSTANŢE MINERALE ÎN URINĂ

4.1. Sodiul şi potasiul

Se dozează prin fotometrie de flacără, făcînd o diluţie adecvată a urinei.

Valorile normale sînt variabile după natura alimentaţiei. În regim desodat, sodiul este în valoare de 400 *mg*/24 ore (170 *mEq*/24 ore). Eliminările de potasiu sînt de 25—100 *mEq*/24 ore.

Scanned with OKEN Scanner

4.2. | Calciul

Se practică pe de o parte proba rapidă de determinare a calciuriei după Sulkowitch, iar pe de altă parte dozări cantitative.

4.2.1. | PROBA SULKOWITCH

Principiu. Calciul urinar este precipitat sub formă de oxalat, intensitatea precipitatului sau a tulburelii permiţînd o apreciere a cal ciuriei.

Reactiv: 2,5 g acid oxalic, 2,5 g oxalat de amoniu, 5 *ml* acid acetic glacial şi apă ad 150 g.

Tehnica. Cîţiva *ml* de urină se amestecă cu o cantitate egală de reactiv. Apariţia imediată a unei tulburăi albe indică o eliminare normală a calciului (corespunde unei calcemii normale). Dacă apariţia tulburării este întîrziată, excreţia urinară a calciului este slabă sau nulă (hipocalcemie). Dacă precipitatul este intens (lăptos), avem o hipercalciurie (corespunde la o hipercalcemie).

La o calcemie constantă calciuria depinde de ingestia alimentară a calciului.

4.2.2. | DETERMINAREA PRIN FOTOMETRIE DE FLACĂRĂ

Urina se va recolta pe timol-alcool izopropilic, iar la sfîrşitul perioadei de prelevare se adaugă 10 *ml* HCl conc. şi se agită bine. Pentru analiza exactă se recomandă precipitarea prealabilă a calciului sub formă de oxalat de calciu urmată de solubilizarea precipitatului în mediu puternic acid. Se poate însă face şi o determinare folosind mai multe diluţii de urină.

4.2.3. | METODA PERMANGANOMETRICĂ

Principiu. Calciul este precipitat cantitativ cu oxalat de amoniu sub formă de oxalat de calciu, la un *pH* de 5—5,5, (pentru a evita, în mediu prea alcalin, antrenarea acidului fosforic, şi, în mediu prea acid, solubilizarea oxalatului). Precipitatul de oxalat de calciu se titrează cu o soluţie de permanganat de potasiu 0,01 *N* în mediu acid.

Reactivi. 1. Acid tricloracetic 20%. *2.* Hidroxid de sodiu 20%. *3.* Indicator Polonovschi (amestec de roşu de metil şi albastru de metil). *4.* Acid acetic 5%. *5.* Soluţie saturată de oxalat de amoniu. *6.* Soluţie amoniac 2%. *7.* Acid sulfuric. *8.* Soluţie de permanganat de potasiu 0,01 *n.*

Tehnica. 2,5 *ml* urină se tratează cu 2,5 *ml* apă, 5 *ml.* acid tricloracetic 10% şi un vîrf de cuţit de cărbune animal. Se filtrează. Se aduc apoi într-un tub de centrifugă 5 *ml* filtrat şi în prezenţă de indi-

Scanned with OKEN Scanner

cator Polonovschi, se adaugă NaOH 20%, picătură cu picătură pînă la mediu alcalin (virarea culorii violete inițiale a indicatorului în verde). Se readuce la culoarea violetă (mediu acid) prin adăugare de acid acetic 5% în porțiuni mici. Se tratează apoi cu 1 *ml* soluție saturată de oxalat de amoniu și se agită, apoi se lasă tubul de centrifugă în repaus timp de minimum 15 minute și se centrifughează 10 minute. Se decantează lichidul, iar precipitatul se spală de 3 ori cu cîte 4—5 *ml* soluție de amoniac 2%, centrifugînd și decantînd după fiecare spălare. După ultima decantare se adaugă la precipitatul rămas 2 *ml* acid sulfuric *N* și se încălzește pe baie de apă timp de 2 minute. Soluția caldă se titrează cu $KMnO_4$, 0,01 *N*, din microbiuretă, pînă la persistența culorii roz.

Calcul.

mg Ca la litru urină = $N \cdot 0{,}2 \cdot 800$

N = nr. *ml* MnO_4K 0,01 *n* utilizați la titrare.

800 = factor de diluție, rezultat din faptul că în lucru s-au luat efectiv 1,25 *ml* urină, cifră care înmulțită cu 800 dă 1000.

0,2 = corespondența în Ca a 1 *ml* $KMnO_4$ 0,01 *n*.

Valori normale: 100—200 *mg* Ca/24 ore (5—10 *mEq*/24 ore). Eliminarea urinară este în funcție de aportul de Ca. De aceea se recomandă ca timp de trei zile înainte de analiză, să se administreze o alimentație săracă în Ca, după care limita superioară a normalului este 65 *mg*/24 ore (8 *mEq*/24 ore). Peste 125 *mg*/24 ore este suspect, iar peste 200 *mg*/24 ore sigur patologică. La copii se procedează examinînd paralel doi copii de aceeași vîrstă, supuși la aceeași alimentație.

Modificări patologice. Hipercalciuria apare în boala Recklinghausen, osteoporoze, după fracturi, hipervitaminoze D, hipercalciurie idiopatică. Hipocalciurie se întîlnește în spasmofilie, tetanie infantilă, hipoparatiroidism, osteomalacie, rahitism.

4.3. | Magneziul

Se recurge la metoda utilizată în cazul serului cu reactivul Mann și Yoe.

4.4. | Fierul

Întrucît dozarea este foarte rar utilizată, se dă numai indicația bibliografică:

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Douris, R. G., Bory, J., Altarovici, J., Ann. Biol. clin., *15*, 683, (1957).

4.5. | Clorul

Se pot folosi mai multe metode.

4.5.1. | METODA SCHALES

Se poate lucra ca în cazul serului şi în final calculăm rezultatul în grame NaCl/24 ore.

Se poate însă prepara reactivul de azotat mercuric în aşa fel încît 1 *ml* din acesta să corespundă la 1 *mg* NaCl.

Reactivi. 1. HNO_3 1 *n:* se prepară din 75 *ml* HNO_3 ($d = 1{,}38$) şi apă bidistilată ad 1000 *ml. 2.* Reactivul de azotat mercuric: 40 *ml* HNO_3 1 *n*, 3 *g* azotat mercuric şi apă distilată ad 1000 *ml.* Se titrează această soluţie, faţă de o soluţie etalon de NaCl 1 *g* la 1000, astfel ca 1 *ml* azotat să corespundă la 1 *mg* NaCl.

Tehnica. Se ia 1 *ml* urină, 9 *ml* apă distilată. 4 picături difenilcarbazonă (preparare ca la ser) şi HNO_3 1 *n* cît este necesar pentru a obţine *pH*-ul = 2 (controlat cu hîrtie indicator) şi se titrează cu reactivul de azotat mercuric pînă la apariţia culorii violete. Numărul de *ml* folosiţi la titrare este egal cu numărul de grame de Cl/litru.

4.5.2. | METODA MOHR

Principiu. Clorurile sînt titrate în mediu neutru sau slab acid (sub formă de clorură de argint) cu o soluţie de azotat de argint (de normalitate cunoscută). Ca indicator se utilizează cromatul de potasiu care în prezenţa unui exces de ioni de argint dă un precipitat roşu de cromat de argint.

Reactivi. 1. Azotat de argint 0,1 *n* (vezi prepararea la soluţii titrate). *2.* Cromat de potasiu 10%. *3.* Soluţie tampon acid acetic-acetat de Na, *pH* = 6,5, 0,1 *M.*

Tehnica. Într-un balon Erlenmeyer se pipetează exact 10 *ml* urină, 2 *ml* soluţie tampon acid acetic-acetat şi 1 *ml* indicator cromat de potasiu. Se titrează din biuretă cu soluţia de azotat de argint 0,1 *n* pînă la persistenţa culorii cărămizii a cromatului de argint. Se notează numărul de *ml* „*N*" de azotat de Ag utilizaţi.

Calcul. Concentraţia clorurilor din urină se exprimă în grame clorură de sodiu la litru, cunoscînd că 1 *ml* $AgNO_3$ 0,1 *n* corespunde la 0,00584 *g* NaCl, deci

$$\text{ClNa } g/\text{litru} = N \cdot 0{,}00584 \cdot 100$$

Scanned with OKEN Scanner

Interpretare. În cazul unei diete obișnuite, cantitatea de cloruri urinare este cuprinsă între 10—15 g la 24 ore. După cîteva zile de dietă fără sare cantitatea clorurilor urinare scade la valori mici (sub 1 g/24 ore) și invers, crește peste valorile normale la un regim hiperclorurat.

Valori crescute (hiperclorurie) se întîlnesc în poliurie, crize postinfecțioase, perioada de debut a scăderii edemelor. Valori scăzute apar în pneumonii, perioada formării edemelor (chiar înainte de apariția acestora, clorurile urinare scad la 1,5—5 g/24 ore, boli febrile acute, insuficiență cardiacă, ocluzia intestinală și insuficiența renală.

4.6. | Fosforul anorganic

Se utilizează metodele descrise la ser, făcînd o diluție a urinei.

4.7. | Sulful urinar

În urină se găsesc trei feluri de sulf: 1) anorganic (sulfați), 2) sulf esterificat (legat de indoxil, fenol și cresol); 3) sulf legat organic (numit și sulf incomplet oxidat sau sulf neutru) ca: cistină, rodanați, sulf proteic.

Pentru dozare aceste forme sînt transformate în (stare de) sulfați și dozate ca atare.

4.7.1. | METODA ROSENHEIM—DRUMOND

Principiu. Sulfații dau cu benzidina un precipitat de sulfat de benzidină greu solubil, care se separă și apoi, prin hidroliză, se desface în hidrat de benzidină și acid sulfuric. Acesta din urmă se titrează cu hidroxid de sodiu.

Reactivi. 1. Soluție de clorhidrat de benzidină. Se iau într-un mojar 2 g clorhidrat de benzidină (pro analysi) cu 5 *ml* apă; se amestecă făcînd un terci și apoi, punînd o pîlnie în gura unui balon cotat de 1 litru, terciul se aduce cu apă (suflată din pisetă) în balon. Mojarul, pistilul și pîlnia se spală bine cu apă. În balonul umplut cca o treime cu soluție, se adaugă 2—5 *ml* acid clorhidric conc. pro anal.; se agită și cînd soluția este clară, se completează la semn cu apă distilată. 150 *cm* din această soluție precipită 0,1 g acid sulfuric. *2.* Soluția saturată de sulfat de benzidină. Se face o soluție concentrată de clorhidrat de benzidină și se adaugă acid sulfuric producîndu-se un precipitat de sulfat de benzidină. Se separă prin decantare apa de dea-

Scanned with OKEN Scanner

supra şi se spală precipitatul cu atîta apă distilată, pînă cînd apele de spălare nu mai înalbăstresc hîrtia de Congo. Acum se pune peste precipitat multă apă distilată caldă, se amestecă bine cu o baghetă şi apoi se filtrează. Apa este saturată cu sulfat de benzidină. *3.* Soluţie hidroxid de sodiu 0,1 *n*. *4.* Acid clorhidric 10%.

Tehnica. Într-un Erlenmayer de 200 *ml* se iau 25 *ml* urină şi se acidulează cu acid clorhidric diluat, pînă cînd lichidul înalbăstreşte hîrtia de Congo. Se adaugă peste urină 100 *ml* soluţie clorhidrat de benzidină. Se agită vasul, se lasă cîteva minute şi se filtrează printr-un filtru mic. Se spală vasul şi filtrul cu apă saturată cu benzidină (2), pînă cînd filtratul nu mai înalbăstreşte hîrtia de Congo. Se ia filtrul cu precipitatul şi se aduce într-un vas Erlenmayer. Se toarnă deasupra 50 *ml* apă distilată, se agită bine, pentru a se diviza precipitatul, şi se încălzeşte la fierbere. Soluţia caldă, se titrează cu hidroxid de sodiu 0,1 *n*, în prezenţa a 2—3 picături de fenolftaleină, pînă la culoarea roz. 1 *ml* hidroxid de sodiu 0,1 *n* corespunde la 4,9 *mg* acid sulfuric. *Observaţie:* în locul hîrtiei de Congo se poate folosi cea de turnesol care virează în roşu în mediu acid.

5. DOZAREA PRINCIPALELOR SUBSTANŢE ORGANICE DIN URINĂ

5.1. Dozarea azotului ureic

5.1.1. METODA CU UREAZĂ

Principiu şi reactivi, vezi dozarea din ser. Atenţiune! Reactivii fiind caustici, se vor pipeta cu multă grijă.

Tehnica. Pentru fiecare serie de analize se prevăd 1—2 probe standard şi o probă în alb.

În eprubete se vor pipeta următoarele soluţii:

Soluţii	*Proba*	*Standard*	*Proba în alb*
Suspensie urează	0,2 *ml*	0,2 *ml*	0,2 *ml*
soluţie standard (etalon)	—	0,02 *ml*	—
urină diluată 1 : 100	0,02 *ml*	—	—
apă bidistilată (deionizată)	—	—	0,02 *ml*

Se agită bine, se acoperă şi se lasă 30 de minute la temperatura ambiantă (20—25°C) sau 15 minute la 37°C. Apoi se pipetează în continuare:

reactiv fenolic	1,0 *ml*	1,0 *ml*	1,0 *ml*
reactiv cu hipoclorit	1,0 *ml*	1,0 *ml*	1,0 *ml*

Se agită bine, se lasă în repaus 30 de minute la temperatura ambiantă (20—25°C) sau 15 minute la 37°C. Se diluează cu 10 *ml* apă

Scanned with OKEN Scanner

distilată, după care se măsoară densitatea optică a probelor şi a standardului la 620 *nm* faţă de proba în alb.

$$\textit{Calcul:}\ g\ \text{uree/24 ore} = \frac{E_P}{E_S} \cdot 40 \cdot V$$

$$g\text{N}_2\ \text{ureic/24 ore} = \frac{E_P}{E_S} \cdot 18{,}7 \cdot V$$

unde E_P = densitatea optică a probei
E_S = densitatea optică a standardului
V = volumul urinei eliminate în 24 ore, exprimat în litri.

Valori normale: 20—30 *g* uree/24 ore.
9—17 *g* azot ureic/24 ore.

Observaţii. Cînd densitatea optică a probei este mai mare de 1,5, se repetă analiza cu o urină diluată 1:200, iar rezultatul se înmulţeşte cu 2.

BIBLIOGRAFIE

1. Richterich, R., *Klinische Chemie*, Akademische Verlagsgesselschaft, Frankfurt am Main, ed. 2, 1968, 254. 2. Fawcett, J. K., Scott, J. E., J. Clin. Path., *13*, (1960), 156. 3. * * * Merckotest, 1971, p. 96—97. 4. Chaney, A. L., Marbach, E. P., Clin. Chem., 8, (1962), 130.

5.1.2. | METODA KOWARSKY

Principiu, reactivi şi *aparatură,* vezi dozarea din ser.

Tehnica. Cu ureometrul Kowarsky se procedează în felul următor: luăm mai întîi densitatea urinei. Dacă urina are o densitate pînă la 1,01, se va dilua de două ori (un volum urină + un volum apă); pînă la densitatea 1,02, de trei ori (1 volum urină + 2 volume apă); peste densitatea 1,02, de patru ori (1 volum urină + 3 volume apă).

Urina diluată se tratează exact aşa cum s-a arătat la sînge. Pentru urinele foarte concentrate, se va lua însă 10 *ml* soluţie de hipobromit de sodiu. Rezultatul se înmulţeşte cu 2, cu 3 sau 4, după modul în care s-a efectuat diluarea urinei.

5.2. | Dozarea acidului uric

Principiu, reactivi, tehnică, vezi dozarea din ser.

Observaţii. Pentru dozarea acidului uric din urină, aceasta se diluează 1/10, din care se iau în lucru 0,1 *ml.*

Scanned with OKEN Scanner

Valori normale: 30—80 *mg* acid uric/24 ore.

La copii eliminarea este între 10—30 *mg*/24 ore. Eliminarea de acid uric variază considerabil cu vîrsta şi cu regimul alimentar.

Raportul acid uric/uree = 1/40 = 0,025.

Creşterea acestui raport indică o hiperdistrucţie a nucleoprotidelor sau o funcţie deficitară a celulei hepatice.

Scăderea acestui raport poate indica o reţinere a acidului uric în sînge.

5.3. Analiza aminoacizilor

5.3.1. DOZAREA AMINOACIZILOR TOTALI

Principiu. După îndepărtarea amoniacului (prin tratare cu hidroxid de potasiu pe discuri de hîrtie de filtru), azotul total al aminoacizilor se determină prin reacţia de culoare cu ninhidrină. Se formează un compus colorat violaceu; utilizarea ninhidrinei în soluţie neapoasă previne interferenţa cu ureea.

Reactivi. 1. Soluţie EDTA (A). Se dizolvă 500 *mg* EDTA în 50—60 *ml* apă distilată, prin uşoară încălzire. Se răceşte, se aduce la *pH* = 7,2 cu soluţie NaOH 10% şi se completează cu apă distilată la 100 *ml*. *2.* Soluţie EDTA alcalină (B). Se dizolvă 500 *mg* EDTA în 100 *ml* NaOH soluţie 1 *N*. *3.* Reactiv ninhidrină. Se dizolvă 200 *mg* triceto-hidrinden-hidrat $C_6H_4 - 1,2 - (CO)_2—CO \cdot H_2O$, în 50 *ml* alcool etilic absolut. Se adaugă 50 *ml* etilen-glicol (sau 2-metoxietanol) şi 1 *ml* acid acetic glacial p.a. Reactivul se prepară extemporaneu dar se poate utiliza în interval de 24 de ore de la preparare, dacă e păstrat la frigider. *4.* Discuri de hîrtie, tratate cu KOH. Se face o soluţie 30% KOH în etanol 96%. Se pune soluţia într-un cilindru gradat şi se umectează benzi de hîrtie Whatman 3 MM, de 3 *cm* lăţime (se poate utiliza orice hîrtie de filtru cantitativă de grosime similară). Se usucă hîrtiile la temperatura camerei. După uscare, din benzi se taie pătrăţele de 3/3 *cm*, se taie colţurile şi rezultă suprafeţe octogonale care se păstrează timp nelimitat într-un borcan cu dop şlefuit care conţine silicagel. *5.* Discuri standard. Se cîntăresc exact 42 *mg* acid glutamic p.a., se transferă cantitativ într-un balon cotat şi se dizolvă în 50 *ml* soluţie EDTA (sol. A). Se completează cu apă distilată la volum final de 100 *ml*. Se pregătesc 2 discuri standard (pe hîrtie reactiv 4), cu soluţie standard: 0,05 *ml* şi 0,1 *ml* soluţie acid glutamic. Se notează hîrtiile cu un creion: cantităţile de azot aminoacidic (grupe NH_2) conţinute în probe sînt de 2 µg şi respectiv 4 µg. Discurile se păstrează aproximativ 3 luni dacă sînt ţinute sub silicagel, în vase bine închise. *6.* Al-

Scanned with OKEN Scanner

cool etilic 50%. Într-un balon cotat de 500 *ml*, se amestecă 250 *ml* alcool etilic absolut și aproximativ 230 *ml* apă distilată. Se lasă să se răcească și se completează la 500 *ml* cu apă distilată.

Tehnica dozării în urină. Se amestecă 2 *ml* urină (din cantitatea de 24 ore) cu 2 *ml* soluție EDTA (sol. A), iar 0,1 *ml* din amestec se aplică pe un disc de hîrtie tratat cu KOH. Se evaporă prin uscare cu un curent de ser. Discul de hîrtie se pune pe o placă Petri și se lasă la 125°C timp de 10 minute.

Se prinde discul de hîrtie cu o pensă, se rulează și se pune într-o eprubetă (150/16 *mm*) gradată la 10 *ml*. Se procedează identic cu discurile standard și cu proba în alb (hîrtie cu KOH). Se adaugă apoi cîte 5 *ml* soluție ninhidrină (reactiv 3), se astupă cu dop de sticlă sau cu foiță de staniol și se fierb pe baia de apă timp de 20 minute.

După răcire la temperatura camerei se adaugă etanol 50% (R_6), pînă la 10 *ml*, se amestecă și se citesc extincțiile probei și standardului, la 570 *nm* în cuva de 1 *cm*, față de proba în alb.

Calcul. Se raportează absorbția probei la valoarea standard apropiată culorii probei. Calculul utilizat pentru standardul 2 μg azot aminoacidic.

$$\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times \frac{2}{1000} \times \frac{1000}{0{,}050} = \frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 40 = mg \text{ azot aminoacidic/1000 } ml.$$

Pentru standardul cu 4 μg azot aminoacidic

$$\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 80 = mg \text{ azot aminoacidic/1000 } ml.$$

Tehnica dozării în ser. Se amestecă 2 *ml* ser proaspăt, nehemolizat, 2 *ml* wolframat de sodiu 3% și 2 *ml* H_2SO_4 1 *N*. Se lasă 5 minute pentru precipitarea proteinelor, se centrifughează. Din supernatant se iau 2 *ml*, se adaugă 1 *ml* soluție EDTA alcalină (soluția B) și din amestec se pun 0,2 *ml* pe un disc de hîrtie octogonală în condițiile descrise la urină. Se utilizează proba în alb și standardurile de la urină.

Calcul pentru standard 2 μg:

$$\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times \frac{2}{1000} \times \frac{100}{0{,}044} = mg/100 \text{ } ml$$

$$\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 4{,}54 = mg \text{ azot aminoacidic/100 } ml$$

Pentru standard 4 μg:

$$\frac{E \text{ probei}}{E \text{ standard}} \times 9{,}1 = mg \text{ azot aminoacidic/100 } ml.$$

Scanned with OKEN Scanner

Interpretarea modificărilor aminoacidemiei şi aminoaciduriei.

Valorile normale ale aminoacizilor în plasmă sînt de 4—6 *mg* azot aminoacidic/100 *ml*; aminoaciduria normală este de 100—500 *mg* azot aminoacidic/24 *h*.

Scăderea aminoacizilor plasmatici se constată uneori în sindromul nefrotic în timp ce creşterea aminoacidemiei se observă în insuficienţele hepatice grave, în uremie şi în unele defecte cu caracter genetic în metabolizarea acizilor aminaţi. Creşterea eliminărilor urinare globale (neselective) de acizi aminaţi survine în insuficienţele hepatice grave, în sindromul nefrotic, în mielom, în intoxicaţii cu metale grele, în boala Wilson şi în sindromul Fanconi. Aminoacidurii selective interesînd doar unii acizi aminaţi survin în deficite genetice ale procesului de reabsorbţie tubulară a respectivilor acizi aminaţi.

BIBLIOGRAFIE

Szentirmai, A., Braun, P., Horvath, I., Hauk, M., Clin. Chim. Acta, 7 (1962), p. 959.

5.3.2. | SEPARAREA CROMATOGRAFICĂ A ACIZILOR AMINAŢI

Diverşi aminoacizi liberi din lichidele biologice sînt în cantităţi mici, fapt ce îngreuiează identificarea lor. Metoda cromatografică a permis rezolvarea cu succes a acestei probleme.

În practică, separarea aminoacizilor se limitează la analiza unor aminoacidopatii rare, întîlnite mai ales în clinica pediatrică. Din acest motiv indicăm doar bibliografie pentru cromatografia pe hîrtie (O'Brien şi Ibbot, 1962, Lynch şi colab., 1969), cromatografie în strat subţire (Bremer şi colab., 1969) şi cromatografie pe răşini schimbătoare de ioni (Stein şi Moore, 1954, Blackburn, 1968). De notat că la ora actuală există tendinţa de a se înlocui cromatografia pe hîrtie prin ultimele două procedee menţionate.

BIBLIOGRAFIE

O'Brien, D., Ibbot, E. A., *Laboratory Manual of Pediatric Micro and Ultramicro-Biochemical Techniques*, Ed. Harper and Row, New York, 1962. Lynch, M. I., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Inwood, M.I.H., *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology*, Ed. W. B. Saunders, Bremer, H., Nützenadel, W., Bickel, H., Monatschrift für Kinderheilkunde, 117 (1969), 32. Moore, S., Stein, W. H., J. Biol. Chem., 211 (1954), 893. Blackburn, S., Amino-Acid Determination. Methods and Techniques, Ed. M. Dekker, New York, 1968.

Scanned with OKEN Scanner

5.4. Dozarea creatininei şi creatinei în urină

5.4.1. DOZAREA CREATININEI URINARE

Principiul şi reactivii au fost arătaţi anterior (vezi dozarea creatininei şi creatinei în ser).

Tehnica. Se colectează urina pe 24 ore amestecîndu-se diverse porţiuni şi măsurîndu-se volumul total. Din această cantitate se ia 1 *ml* şi se diluează la 100 *ml* cu apă distilată. Se pipetează 3 *ml* urină diluată într-o eprubetă şi se amestecă cu 1,5 *ml* picrat alcalin. Se prepară o probă în alb şi două probe standard şi se măsoară extincţiile aşa cum s-a arătat în cazul determinărilor efectuate în ser.

Calcul. Ţinîndu-se cont de concentraţiile în creatinină a celor două probe standard, de volumul de urină luat în lucru (3 *ml* urină diluată 1/100 = 0,03 urină) şi volumul urinei pe 24 ore (V) se va folosi următoarea formulă de calcul:

Folosind standard I

$$mg \text{ creatinină/24 ore} = \frac{E \text{ probei}}{E \text{ stand.}} \times 0{,}03 \; mg \times \frac{V}{0{,}03 \; ml}.$$

Folosind standard II

$$mg \text{ creatinină/24 ore} = \frac{E \text{ probei}}{E \text{ stand.}} \times 0{,}01 \; mg \times \frac{V}{0{,}03 \; ml}.$$

Valori normale: 1000—1800 *mg*/24 ore la bărbaţi
700—1500 *mg*/24 ore la femei

Întrucît eliminările de creatinină sînt în legătură cu greutatea corporală (şi mai ales cu masa musculară), valorile normale pot fi exprimate sub forma de coeficient creatininic, reprezentînd eliminările de creatinină pe *kg* greutate corporală şi pe 24 ore. Calculate în acest mod valorile normale devin:

bărbaţi adulţi	20 —26	*mg/kg*/24 ore
femei adulte	14 —22	*mg/kg*/24 ore
băieţi 12—17 ani	20 —28	*mg/kg*/24 ore
fete 12—17 ani	12 —29	*mg/kg*/24 ore
copii de 6—11 ani	6,4—21	*mg/kg*/24 ore
copii de 2—3 ani	12	*mg/kg*/24 ore
nou-născuţi la termen	10 —15	*mg/kg*/24 ore
nou-născuţi prematuri	8,3—19,9	*mg/kg*/24 ore.

Observaţii. Dacă culoarea obţinută este prea intensă sau prea palidă pentru obţinerea unor citiri corecte a extincţiei se modifică gradul de diluţie al urinei ţinîndu-se cont de aceste modificări la calcul.

Determinările de creatinină urinară se folosesc în special pentru probele de clearance (vezi mai departe).

Scanned with OKEN Scanner

5.4.2. | DOZAREA CREATINEI URINARE

Principiul şi reactivii au fost arătaţi anterior (vezi metoda pentru ser).

Tehnica. Se amestecă 1 *ml* urină cu 0,4 *ml* HCl 5 *N* şi 3,6 *ml* apă distilată într-o eprubetă gradată şi se încălzeşte pe baie de apă la fierbere timp de o oră. Se răceşte şi se ajustează volumul la 5 *ml* cu apă distilată. Se amestecă din nou şi se pipetează într-o altă eprubetă 1 *ml* amestec care se diluează cu 19 *ml* apă distilată (diluţia finală a urinei devine astfel 1/100).

Se ia apoi 3 *ml* din această ultimă diluţie de urină şi se amestecă cu 1,5 *ml* reactiv picrat alcalin. Se prepară o probă în alb conţinînd 3 *ml* apă distilată în loc de urină şi o probă standard conţinînd 3 *ml* soluţie standard de creatinină (0,01 *mg/ml*) adăugîndu-se acestora 1,5 *ml* picrat alcalin.

Simultan se determină creatinina din urina neîncălzită după cum s-a arătat la punctul anterior.

Calcul. Valorile creatininei totale (în urina încălzită) şi a creatininei din urina neîncălzită se raportează la urina pe 24 ore după formula prezentată anterior.

Creatinina derivată din creatina urinară = creatinina totală din urina încălzită — creatinina din urina neîncălzită.

Creatina urinară = creatinina derivată din creatina × 1,16.

Valori normale. La bărbaţii normali eliminările urinare de creatină nu depăşesc 150 *mg*/24 ore (aproximativ 2,1 *mg/kg*/24 ore la un bărbat de 70 *kg*). La femei, creatina urinară poate ajunge la valori de 250 *mg*/24 ore (aproximativ 4 *mg/kg*/24 ore pentru o femeie de 60 *kg*).

La băieţii de 12—17 ani, creatina este de 0,2—4,5 *mg/kg*/24 ore.

La fete adolescente, valorile sînt de 1,3—19,8 *mg/kg*/24 ore.

La copii de 6—11 ani, valorile creatinei sînt de 2,2—7,4 *mg/kg*/24 ore.

La copii de 2—3 ani 8 *mg/kg*/24 ore, iar la nou-născuţi 6,2—15,7 *mg/kg*/24 ore.

Eliminări urinare patologic crescute ale creatinei se întîlnesc în boli ale musculaturii (distrofie musculară progresivă, miastenia gravă, miozite, dermatomiozite).

BIBLIOGRAFIE

Lynch, M. L., Raphael, S., Mellor, L.D., Spore, P.D., Inwood, M. Y. H., *Medical Laboratory Technology and clinical Pathology*, Ed. W. B. Saunders, Phyladelphia—London—Toronto, 1969.

Scanned with OKEN Scanner

6. | PROBE DE CLEARANCE RENAL

Noţiunea de coeficient de depurație sau clearance (Cl) al unei substanţe reprezintă cantitatea de plasmă în mililitri curăţată de acea substanţă în unitatea de timp (un minut).

Notînd cu u concentraţia acelei substanţe în urină (mg/ml), P = concentraţia în plasmă (mg/ml) şi d = debitul urinar (ml/minut), $Cl \times P = d \times u$; adică cantitatea de substanţă depurată din plasmă în decurs de un minut este egală cu cantitatea de substanţă eliminată prin urină în acelaşi interval de timp. De unde

$$Cl = \frac{u}{P} \times d.$$

Dacă o substanţă se elimină din sînge prin filtrare glomerulară, coeficientul de depurație al acelei substanţe (clearance glomerular) reprezintă numărul de mililitri de plasmă filtraţi la nivelul glomerulului în decurs de un minut. Astfel de substanţe sînt creatinina, inulina, manitolul. Dacă o substanţă se elimină în special prin excreţie tubulară, coeficientul său de depurație (clearance tubular) va constitui o măsură a irigaţiei renale şi va reprezenta numărul de mililitri de plasmă care irigă rinichiul în decurs de un minut. Asemenea substanţe sînt ac. PAH, diiodrastul, neorenumbralul.

6.1. Clearance creatininic endogen

În caz de valori normale sau moderat crescute ale creatininei plasmatice, eliminarea acestei substanţe se face în special prin filtrare glomerulară astfel încît prin determinarea creatininei în sînge şi urină şi prin măsurarea debitului urinar se poate calcula un coeficient de depurație care furnizează relaţii suficient de fidele asupra filtrării glomerulare.

Procedeu. Dimineaţa a jeun subiectul îşi va goli vezica urinară şi va ingera 250 ml apă pentru asigurarea unui debit urinar de cel puţin 1 ml/minut. Medicamentele diuretice precum şi ceaiul sau cafeaua vor fi oprite. Se colectează apoi urina pe un interval de 3 ore (180 minute), iar la jumătatea perioadei de timp în care se recoltează urina, se ia o probă de sînge. Se determină concentraţiile de creatinină în ser (P) şi urină (U) după metodele expuse anterior. Se calculează apoi coeficientul de depurație după formula:

$$\text{clearance creatininic } (ml/min) = \frac{u \times d}{P} \text{ unde } d = \frac{V}{180}$$

V reprezentînd volumul de urină emis în decurs de 180 minute.

Scanned with OKEN Scanner

Valori normale: 75—160 *ml*/minut, valoarea medie fiind 120 ml/minut.

Observaţii. Determinarea valorii clearance se poate efectua şi în lipsa unui standard creatinină, ţinîndu-se cont la calcul de raportul extincţiilor probelor de urină şi ser în loc de raportul concentraţiilor de creatinină. Erorile sînt mici, datorită linearităţii curbei, concentraţia fiind proporţională cu extincţia în acest domeniu de lucru.

Tehnica pentru ser este aceea descrisă anterior, iar în cazul urinei se procedează în modul următor:

2 *ml* urină diluată 1/50 se amestecă cu 2 *ml* apă distilată, 1 *ml* wolframat de sodiu 10% şi 1 *ml* H_2SO_4 2/3 *N*. După centrifugare se iau 3 *ml* din supernatantul clar şi se procedează ca în cazul serului. (Acest procedeu este cu atît mai indicat în cazul urinelor patologice conţinînd albumină). În astfel de condiţii:

$$\text{Clearance creatininic } (ml/\text{minut}) = \frac{E \text{ urinei} \times 50}{E \text{ serului}} \times d$$

50 = diluţia urinei
d = diureza/minut.

Clearance-ul creatininic este susceptibil unor erori:

Prin reacţia Jaffé în afara creatininei adevărate (75%) dozăm şi substanţe cromogene (25%) chiar şi la deproteinizarea cu wolframat şi acid sulfuric. Pentru acest motiv limita superioară a clearance-ului creatininic este 160 *ml*/minut. În circumstanţe patologice proporţia substanţelor cromogene creşte paralel cu creatinina (uneori mai mult) constituind o sursă de eroare.

La om creatinina se excretă şi tubular, dar în proporţie neglijabilă în cazuri normale. În afecţiuni renale cu hipercreatininemie, excreţia de creatinină prin tubi poate ajunge pînă la 40%, falsificînd valoarea reală a filtraţiei glomerulare. De asemenea în situaţia unor concentraţii mari în sînge, eliminarea se face şi tubular.

Deficienţa în procedeul de recoltare al urinei este întîlnită frecvent. Pentru a reduce pe cît posibil această eroare, se recoltează urina pe 24 ore sau măcar pe 8 ore. Evident în acest caz pentru aflarea debitului urinar pe minut (d) se va împărţi volumul urinei pe 24 ore la 1440, iar volumul urinei pe opt ore la 480.

Oliguria deprimă eliminarea creatininei, aşa că este nevoie de o diureză care să depăşească 1 *ml*/minut, pentru a evita această eroare.

Cu aceste rezerve şi precauţii, clearance-ul creatininic endogen constituie o probă suficient de sensibilă, iar scăderea progresivă a acestui coeficient de depuraţie indică evoluţia spre o insuficienţă renală.

Proba este uşor de efectuat şi nu aduce modificări circulatorii prin perfuzii, fiind frecvent utilizată în practica clinică.

Scanned with OKEN Scanner

Metode mai precise pentru determinarea clearance-ului glomerular se bazează pe injectarea i.v. a inulinei sau manitolului şi pe determinarea coeficientului de depurație al acestor substanțe care se elimină exclusiv prin filtrare glomerulară.

6.2. | Clearance glomerular cu inulină

Inulina este considerată substanța perfectă din punct de vedere al explorării glomerulare.

Procedeu. Bolnavul stă la pat. Se recoltează 5 *ml* sînge pe 1—2 picături heparină, constituind proba în alb de sînge *Po*. Se evacuează vezica, se păstrează urina ca probă în alb a urinei *Uo*.

Administrarea inulinei se face în perfuzie i.v. continuă sau în injecție unică.

Perfuzia i.v. continuă de inulină. După Smith, doza inițială de atac constă în injectarea a 30 *ml* inulină 10% diluată în 250 *ml* ser fiziologic cu ritmul de 20 *ml*/minut. Se obține astfel rapid o concentrație de aproximativ 18—25 mg%, necesară pentru aprecierea filtrării glomerulare. Imediat după terminarea dozei inițiale, se instalează perfuzia cu doza de întreținere, care constă în perfuzarea a 70 *ml* soluție inulină 10% diluată în 500 *ml* ser fiziologic cu ritmul de 4 *ml*/minut. Scopul acesteia este menținerea constantă a concentrației sanguine realizată prin doza inițială. După 20 minute de la instalarea perfuziei de întreținere, se evacuează vezica și se aruncă urina. După 30 minute se recoltează 5 *ml* sînge pe heparină P_1. La 40 minute se recoltează urina U_1. La 50 minute sîngele P_2, la 60 minute urina U_2.

În total se disting două perioade a cîte 20 *min.* fiecare, cu recoltarea probei de sînge la mijlocul perioadei.

Perfuzia cu injecție unică i.v. după Alving și Miller.

Se recoltează 5 *ml* sînge pe heparină, *Po*, se evacuează vezica, se reține urina martor *Uo*. Se administrează 10 g inulină în injecție unică de soluție inulină 10% în timp de 5—10 *min.* Prima perioadă de clearance începe 30 minute mai tîrziu, timp necesar distribuirii inulinei în volumul circulant. Recoltările se efectuează în două perioade a cîte 20 *min.* fiecare (la 30 *min.* de la administrarea injecției se evacuează vezica, se aruncă urina, la 40 minute se recoltează sînge P_1, la 50 *min.* urina U_1, la 60 minute P_2, la 70 minute U_2). Se măsoară volumul fiecărei porțiuni de urină și se calculează debitul/minut: $\frac{V}{20\ min.} = d.$

Scanned with OKEN Scanner

Date privind dozarea inulinei în sînge şi urină cu rezorcină (metoda Roe — De Kruhoffer)

Principiu. Inulina este hidrolizată la fructoză, care dă cu rezorcină reacţia Selivanoff, al cărei produs este colorat roşu portocaliu.

Reactivi. 1) Rezorcină-tiouree: rezorcină 0,10 *g*, tiouree 0,25 *g*, soluţie acid tricloracetic 10%, 100 *ml*. Conservat în flacon închis. *2*) HCl (d = 1,10) 5 părţi, apă distilată o parte. *3*) Standard inulină concentrat, 1 *mg/ml*. Se diluează 1: 50 pentru a obţine o soluţie de lucru de 0,02 *mg/ml*. *4*) Soluţie A: $SO_4Zn \cdot 7H_2O$ 10%. Soluţie B: NaOH 0,5 *N*. Aceste două soluţii A şi B trebuie să se neutralizeze volum la volum la titrare, în prezenţa fenolftaleinei.

Tehnica dozării: 1 *ml* plasmă sau 1 *ml* urină diluată (1 : 100 sau 1 : 200) este deproteinizat, respectiv defecat, adăugînd 15 *ml* apă distilată, 2 *ml* soluţie A şi 2 *ml* soluţie B. După 10 minute se centrifughează sau se filtrează. La 2 *ml* filtrat adăugăm 1 *ml* reactiv rezorcină şi 7 *ml* HCl. În paralel se pregătesc: un standard, conţinînd 2 *ml* soluţie inulină 0,02 *mg/ml* şi o probă în alb a reactivilor cu 2 *ml* apă distilată. Se adaugă apoi cîte 1 *ml* rezorcină şi 7 *ml* HCl. În continuare, probele sînt puse în baie de apă la 80°C, timp de 10 minute, pentru hidroliză. Se scot, se răcesc şi după 5 *min.* se citesc extincţiile la 520 *nm*. Standardul este citit faţă de proba cu apă, (proba în alb a reactivilor), sîngele faţă de proba martor de sînge *Po*, iar urinele faţă de *Uo* (vezi pag. 449).

Calcul

$$\text{Inulina } mg\% = \frac{Ex \text{ probei}}{Ex \text{ standard}} \times 40.$$

La urină, înmulţim rezultatul obţinut, cu diluţia 100 sau 200.

$$\text{Clearance}_1 \text{ inulină} = \frac{U_1 \times d_1}{P_1}; \quad \text{Clearance}_2 \text{ inulină} = \frac{U_2 \times d_2}{P_2}$$

$$\text{Clearance inulină } ml/min = \frac{Cl_1 + Cl_2}{2}$$

Valori normale

La adultul sănătos, clearance-ul inulinic este 130 *ml/min.* ± 30.

Observaţii. Toleranţa la inulină trebuie testată înainte de administrare la fiecare bolnav. Orice set de fiole trebuie testat pe animale, în privinţa impurităţilor piretogene prezente.

Dozarea se poate efectua şi fără tiouree.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. Roe — De Kruhoffer, Acta physiol. Scand., 1946, 11, pag. 16. 2. Hamburger, *Nephrologie*, Ed. Med. Flammarion, Paris, 1966, pag. 236—238; 267—269.

6.3. | Clearance glomerular cu manitol

Manitolul este obţinut în stare purificată mai uşor decît inulina, iar valorile clearance glomerular sînt asemănătoare cu ale inulinei la subiecţi sănătoşi sau bolnavi.

Procedeu. Bolnavului, ţinut la pat, i se recoltează sînge *Po* şi se evacuează vezica păstrînd urina *Uo*. Apoi se administrează manitol prin unul din următoarele procedee:

Perfuzia i.v. continuă. Smith propune perfuzia iniţială, de atac, formată din soluţie manitol 25%. Se administrează 80 *ml* soluţie manitol 25% diluat în 250 *ml* ser fiziologic, cu ritmul de 20 *ml*/minut. Soluţia de întreţinere, care se instalează în continuare este formată din 80 *ml* manitol 25%, diluat în 500 *ml* ser fiziologic, cu ritm de 4 *ml*/minut.

La 20 minute de la instalarea perfuziei de întreţinere, se evacuează vezica, se aruncă urina, notîndu-se timpul *t*. După 10 minute de la această operaţiune se recoltează 10 *ml* sînge pe florură de Na, P_1. La 20 minute de la timpul *t*, se recoltează urina U_1. La 30 *min.* sînge P_2. La 40 minute urina U_2.

În total se disting 2 perioade, a 20 minute fiecare, sîngele fiind recoltat la mijlocul fiecărei perioade.

Perfuzia cu injecţie unică i.v. Newmann, Bordley, Winternitz propun injectarea a 50 *ml* manitol 25%, într-un timp scurt, 5—10 minute. Înaintea administrării manitolului, se recoltează sînge *Po* şi se evacuează vezica păstrînd urina martor *Uo*.

Prelevarea probelor urmează după 20 minute de la administrarea manitolului şi comportă acelaşi sistem, ca la perfuzie continuă. (La 20 minute se evacuează vezica, se aruncă urina. La 30 minute sînge P_1. La 40 minute urina U_1. La 50 minute P_2. La 60 minute U_2).

Dozarea manitolului în sînge şi urină, după Hamburger şi colaboratorii.

Principiu. Sîngele este deproteinizat cu oxid de cadmiu în stare născîndă. Manitolul este oxidat cu acid periodic la aldehidă formică. Acţiunea oxidantă a periodatului este oprită apoi, cu clorură stanoasă. Aldehida formică este tratată cu acid cromotropic în mediu de acid sulfuric. Se formează o coloraţie roşie purpurie, a cărei intensitate este proporţională cu concentraţia în manitol.

Reactivi. 1) Soluţie de sulfat de cadmiu $CdSO_4 \cdot 8H_2O$, 34,7 g, H_2SO_4 *N*, 170 *ml*, apă distilată ad 1000 *ml*. 2) NaOH *N*. 3) Soluţie de acid periodic. Periodat de K 4 g, ad 1000 *ml* acid sulfuric 16%. Păstrat la întuneric. 4) Soluţie de clorură stanoasă $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, 23,5 g în 50 *ml* HCl conc. ($d = 1{,}17$), se agită pînă la dizolvare, apoi se completează cu apă distilată la 1000 *ml*. Soluţia este stabilă 10 zile la adăpost de aer. 5) Reactiv cromotropic. Se prepară din amestecul a două soluţii A şi B. Soluţia A: acid cromotropic (1—8 dihidroxynaphtaline-1-6-disulfonic) 5% în apă distilată. Se poate utiliza după 24 ore de la preparare. Se păstrează 10 zile la întuneric, temperatură scăzută şi la adăpost de aer. Soluţia B: acid sulfuric 96,6‰. Reactivul cromotropic se prepară extemporaneu amestecînd 4 *ml* soluţie A cu 100 *ml* soluţie B. 6) Soluţie de manitol. Se usucă manitolul la 100°C 24 ore. Se prepară o soluţie 0,1 g manitol la 1000 *ml*. Corespunde la 100 µg/*ml* = St. I. Prin diluţia acesteia 1 : 2 se obţine un standard de 50 µg/*ml* = St. II.

Tehnica dozării. Se măsoară volumul urinei şi se calculează diureza/minut $\frac{V}{20}$. La 1 *ml* plasmă sau 1 *ml* urină diluată 1:100 sau 1:200 se adaugă respectînd ordinea: 10 *ml* apă distilată, 3 *ml* soluţie acidă de sulfat de cadmiu, se agită, apoi se adaugă 1 *ml* soluţie NaOH *N*. Se lasă să stea 10 minute, se centrifughează la turaţie mare.

Se pipetează 1 *ml* supernatant. În paralel se începe de la această etapă un alb al reactivilor şi un standard, punînd 1 *ml* apă distilată pentru blanc şi cîte 1 *ml* soluţie manitol pentru probele standard de 50 şi 100 µg/*ml*. Se adaugă în toate cîte 0,5 *ml* acid periodic, se lasă 10 minute pentru oxidare, apoi se opreşte reacţia cu 0,5 *ml* soluţie clorură stanoasă. Se agită (o concentraţie mică de manitol duce la formarea unei coloraţii galbene; o concentraţie mare, la precipitarea oxizilor de staniu). Se adaugă cîte 5 *ml* reactiv cromotropic, se agită, se ţine 30 *min.* pe baie de apă la 100°C. Se răceşte, iar coloraţie roşie se citeşte la 580 *nm*, probele de sînge faţă de sîngele *Po*, probele de urină faţă de urina *Po*, Standardele I şi II faţă de albul reactivilor.

Calcul. Manitol *mg*% Pentru Standard II $= \frac{Ep}{Est_{II}} \times 76$. Pentru standard I = 100 µg/*ml*; Manitol *mg*% $= \frac{Ep}{Est_{I}} \times 152$.

Ep = extincţia probei; *Est* = extincţia standard; 76, 152 = coeficienţi de calcul.

În cazul urinei, ţinem seama de diluţia făcută, înmulţind rezultatul final cu 100 sau 200, după cum e cazul.

Scanned with OKEN Scanner

Cunoscînd concentraţiile de manitol în sînge şi urină în *mg%*, precum şi diureza pe minut (volumul urinei împărţit la 20), calculăm coeficientul de depuraţie al manitolului pentru fiecare perioadă, aplicînd formula clasică $\frac{U \times d}{P}$, în care U = manitol în urina *mg%*; d = diureza pe minut; P = manitol în sînge *mg%*.

Facem media celor 2 valori corespunzătoare celor două perioade şi obţinem valoarea finală a clearance-ului manitol, în *ml*/minut.

Valori normale 120—130 *ml*/minut ± 30.

BIBLIOGRAFIE

1. J. Hamburger, Rykewaert, Duitzent, Argant, Presse Medicale, nr. 56, 1948 p. 721.
2. Zosin, *Explorarea funcţională renală*, Bucureşti, Ed. Medicală, 1955, p. 264.
3. J. Hamburger. *Nephrologie*, Paris, Ed. Flamarion, 1966, p. 269.

6.4. Clearance tubular. Coeficientul de depuraţie al acidului para aminohipuric

Acidul para aminohipuric (PAH) este eliminat din sînge la nivelul rinichiului atît prin filtrare glomerulară, cît şi prin excreţie tubulară. În cazul unor concentraţii mici (sub 10 mg%) de PAH în plasmă, aceasta este depurată de substanţa injectată în cursul unei singure treceri prin rinichi. În acest fel coeficientul de depuraţie PAH constituie o măsură a irigaţiei renale, respectiv a cantităţii de plasmă care trece prin rinichi în decurs de un minut.

Procedeu. Dimineaţa a jeun se administrează subiectului 600 *ml* ceai neîndulcit pentru asigurarea unei diureze bune. După 30 minute se introduce un cateter în vezica urinară şi se colectează urina pentru proba în alb *Uo*. Se recoltează 10 *ml* sînge pentru proba în alb *Po*. Pe acelaşi ac se injectează 10 *ml* soluţie PAH 20%, în decurs de 5 minute.

După 15 minute de la terminarea injecţiei se recoltează 6 *ml* sînge (P_1) se evacuează vezica urinară care este eventual spălată cu 20 *ml* ser fiziologic steril. Această urină şi lichidul de spălare se aruncă. După 20 minute se recoltează alţi 6 *ml* sînge (P_2) şi se colectează urina U_1, spălîndu-se eventual vezica cu 20 *ml* ser fiziologic steril. În acest caz lichidul de spălare se adaugă la urina recoltată în acest interval de timp. După un nou interval de 20 minute se recoltează iarăşi sînge P_3 şi urina în acelaşi fel U_2. După alte 20 minute se repetă procedeul obţinîndu-se sînge P_4 şi urina U_3. Se scoate cateterul.

Intervalul de 20 minute dintre recoltarea probei de sînge P_1 şi P_2 reprezintă perioada de clearance I, următorul interval de 20 mi-

Scanned with OKEN Scanner

nute între recoltările probelor P_2 și P_3 se consideră perioada de clearance II, iar intervalul între recoltările probelor P_3 și P_4 constituie perioada de clearance III. Se măsoară urinele fiecărei perioade. Se dozează acidul PAH în probele de sînge, P_1, P_2, P_3, P_4 și în urinele U_1, U_2, U_3, probele *Po* și *Uo* urmînd a fi utilizate pentru probele în alb.

Date privind dozarea acidului PAH în ser și urină

Principiu. Gruparea amino a acidului para aminohipuric (PAH), într-un filtrat deproteinizat, este diazotată cu acid azotos și cuplată cu clorhidrat de N-etil-α-naftilamină, iar culoarea violetă obținută, se compară cu cea produsă de un standard PAH.

Reactivi. 1) Soluție sulfat de cadmiu. Se dizolvă 17,5 *g* sulfat de cadmiu ($CdSO_4 \cdot 8H_2O$) în 300 *ml* apă distilată și după adăugarea a 84,6 *ml* acid sulfuric *N*, se aduce volumul la 500 *ml* cu apă distilată. Se păstrează pînă la 60 zile la frigider +4°C. *3*) HCl *N*. *4*) Soluție nitrit de sodiu 1% preparată proaspăt. *5*) Soluție acid-aminosulfonic 0,5% conservabilă timp de 20 zile la +4°C. Se poate folosi și o soluție de sulfamat de amoniu $NH_2SO_3NH_4$, de aceeași concentrație. *6*) Soluție de bromhidrat de N-etil-α-naftilamină sau monoclorhidrat de N-naftil N. dietilpropilendiamină (sau N-(1-naftil)-etilen-diaminclorhidrat 0,1%. Soluția se păstrează în sticlă brună la +4°C. *7*) Soluție standard de PAH. Se prepară o soluție stoc prin suspendarea a 20 *mg* acid. PAH în puțină apă și adăugînd picătură cu picătură NaOH 10% pînă la dizolvare, și apoi se completează cu apă distilată la 100 *ml*. Această soluție se păstrează 60 zile în sticlă brună. Soluția standard de lucru se obține prin diluarea unui mililitru din soluția stoc la 100 *ml* cu apă distilată obținîndu-se astfel o concentrație de 0,2 *mg*/100 *ml*.

Tehnica. Pentru deproteinizare se amestecă 6 *ml* soluție sulfat de cadmiu cu 20 *ml* apă distilată, adăugîndu-se apoi picătură cu picătură 2 *ml* ser și 2 *ml* NaOH 1*N*. Se agită bine, se lasă 10 minute și se filtrează. Diluția serului este de 1 : 15. Urina se diluează cu apă distilată, amestecîndu-se bine 5 *ml* urină cu apă distilată și aducîndu-se volumul la 500 *ml*. Se iau apoi 5 *ml* din această diluție și se aduce la 100 *ml* cu apă distilată. Se realizează astfel o diluție finală a urinei de 1 : 2000.

În eprubete separate se iau cîte 10 *ml* din probele de ser deproteinizat, respectiv din urina diluată și se amestecă bine cu cîte 2 *ml* HCl 1*N*. Se adaugă în fiecare eprubetă cîte 1 *ml* soluție nitrit de sodiu (reactiv 4) se agită și se lasă 5 minute la temperatura camerei. Se adaugă apoi 1 *ml* acid aminosulfonic (reactiv 5) se agită bine și după alte 5 *min.* se adaugă 1 *ml* bromhidrat de N-etil-α-naftilamină (reactiv 6). În paralel se pregătește o probă standard amestecîndu-se 4 *ml* soluție

Scanned with OKEN Scanner

standard de lucru (0,2 *mg*/100 *ml*) cu 6 *ml* apă distilată și 3 probe în alb (proba în alb pentru ser, pentru urină, pentru reactivi, ultima necesară la citirea standardului). Proba în alb pentru ser se prepară din serul sîngelui recoltat înainte de administrarea intravenoasă a P.A.H., deproteinizîndu-se întocmai ca și probele de analizat. Proba în alb pentru urină se prepară din urina recoltată înainte de administrarea PAH (*Uo*) și se diluează întocmai ca și urinele din probele de analizat. Proba în alb pentru standard, 10 *ml* apă distilată.

Proba standard (în volum de 10 *ml*) proba alb pentru standard (10 *ml* apă distilată) și cîte 10 *ml* din probele în alb pentru ser și urină se tratează paralel și în același mod cu probele de analizat, adăugîndu-se reactivii necesari pentru dezvoltarea reacției de culoare. Întrucît intensitatea reacției de culoare crește cu timpul, este necesar să se citească extincțiile după cel puțin 60 minute. Citirile se efectuează la 520 *nm* față de probele în alb respective.

Calcul. Se va ține cont că proba standard conține 0,008 *mg* PAH și că din cei 2 *ml* ser supuși deproteinizării și diluției, se iau în lucru doar 0,66 *ml*.

În cazul urinei cei 10 *ml* urină diluată 1 : 2000 din care se efectuează reacția de culoare conțin doar 0,005 *ml* urină nediluată.

$$mg\ \text{PAH}/100\ ml\ \text{ser} = \frac{E\ \text{probei}}{E\ \text{standard}} \times 0{,}008 \times \frac{100}{0{,}66} = \frac{E\ \text{probei}}{E\ \text{stand.}} \times 1{,}2$$

$$mg\ \text{PAH}/100\ ml\ \text{urină} = \frac{E\ \text{probei}}{E\ \text{standard}} \times 0{,}008 \times \frac{100}{0{,}005} = \frac{E\ \text{probei}}{E\ \text{stand.}} \times 160$$

Concentrațiile PAH pot fi obținute și cu ajutorul unei curbe de calibrare. În acest scop din soluția stoc se face diluția 1 : 20 și obținem standard PAH 1 $mg\%$. Din soluția de 1 $mg\%$, facem diluții conținînd de la 0,1 *mg* PAH/10 *ml* la 0,01 *mg*/10 *ml* (de ex. 9 *ml* soluție 1 $mg\%$+1 ml apă corespunde la 0,09 *mg*/10 *ml*.). Se procedează în continuare ca și pentru probele de analizat. Se trasează curba de calibrare, avînd concentrațiile pe abscisă și extincțiile pe ordonată. Valorile găsite pe curbă pentru probele de ser se înmulțesc cu 15, iar pentru urină se înmulțesc cu 2000. Obținem astfel concentrații de PAH la 100 *ml* ser sau respectiv la 100 *ml* urină.

Calcularea coeficientului de depurație PAH. Din concentrațiile de PAH în ser în probele P_1, P_2, P_3, P_4 se calculează valori medii pentru fiecare din cele trei perioade de cîte 20 minute.

$$P_{\text{I}} = \frac{P_1 + P_2}{2}; \quad P_{\text{II}} = \frac{P_2 + P_3}{2}; \quad P_{\text{III}} = \frac{P_3 + P_4}{2}$$

Scanned with OKEN Scanner

Se calculează apoi valorile clearance (Cl) pentru cele trei perioade a cîte 20 minute.

$$Cl_{I} = \frac{U_1}{P_I} \times \frac{V_1}{20}; \quad Cl_{II} = \frac{U_2}{P_{II}} \times \frac{V_2}{20}; \quad Cl_{III} = \frac{U_3}{P_{III}} \times \frac{V_3}{20}$$

unde U_1, U_2, U_3 reprezintă concentraţiile de PAH în cele trei probe de urină P_I P_{II}, P_{III} reprezintă valorile medii ale concentraţiei de PAH în ser pentru perioadele respective de clearance, iar V_1, V_2 şi V_3 indică volumul de urină (+ lichidele de spălare).

La urmă se calculează o valoare medie pentru clearance PAH după formula:

$$Cl_{M} = \frac{Cl_I + Cl_{II} + Cl_{III}}{3}$$

Valori normale

550—800 *ml*/minut la bărbaţi

480—700 *ml*/minut la femei

Observaţii. Pentru deproteinizarea serului se poate folosi acidul tricloracetic 20% în locul sulfatului de cadmiu. În acest caz se amestecă 2 *ml* ser cu 2 *ml* acid tricloracetic şi se centrifughează. Se scot apoi 2 *ml* supernatant şi se amestecă cu 0,5 *ml* nitrit de sodiu 0,1%, 0,5 *ml* acid aminosulfuric 0,5% şi 0,5 *ml* bromhidrat de N-etil-α-naftilamină. În cazul urinei se iau 2 *ml* urină diluată 1 : 50, se amestecă cu 2 *ml* acid tricloracetic 20%. Se centrifughează dacă este cazul. După centrifugare se scot 2 *ml* şi se procedează în continuare ca şi la probele de ser. Dacă coloraţia este prea intensă, se adaugă în toate probele cîte 10 *ml* apă distilată. Se citesc extincţiile în aceleaşi condiţii, faţă de probele în alb.

Calcularea valorii clearance se poate efectua şi în lipsa unui standard de PAH, ţinîndu-se cont de raportul extincţiilor între probele de urină şi ser, raportul diluţiilor şi bineînţeles diureza pe minut.

$$\text{Clearance}_{\text{PAH}} = \frac{E \text{ urină}}{E \text{ ser}} \times 50 \times \text{diureza pe minut.}$$

Sulfamidele dau reacţiile descrise pentru PAH. Acest test nu poate fi efectuat la bolnavii trataţi cu sulfamide.

În cazul bolnavilor care prezintă dificultăţi la recoltare de sînge, putem efectua numai 2 perioade a cîte 20 minute fiecare, cu o singură probă de sînge la mijlocul fiecărei perioade.

În acest caz, la timpul t, evacuăm vezica, aruncăm urina. La $t + 10$ minute recoltăm sînge corespunzător probei P_1. La $t + 20$ mi-

Scanned with OKEN Scanner

nute colectăm urina corespunzătoare probei U_1. La $t + 30$ minute sîngele P_2; la $t + 40$ minute urina U_2.

Probele se lucrează aşa cum s-a amintit, citirile se fac faţă de un *Po* şi *Uo*, pentru probele de sînge respectiv urină, iar standardul faţă de un alb al reactivilor. Calculul se face la fel, obţinînd concentraţia în *mg%* pentru fiecare probă P_1, P_2 şi U_1, U_2.

Se calculează cele 2 valori clearance corespunzătoare celor două perioade

$$Cl_{\text{I}} = \frac{U_1}{P_1} \times \frac{V_1}{20} \quad Cl_{\text{II}} = \frac{U_2}{P_2} \times \frac{V_2}{20}$$

Se face o medie Cl mediu $= \frac{Cl_{\text{I}} + Cl_{\text{II}}}{2}$

BIBLIOGRAFIE

Hoffman, W. S., *The Biochemistry of Clinical Medicine*, Ed. Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago, 1964, p. 310.
Varley, A: Practical Clinical Biochemistry, Interscience Book, New York 1962, p. 135—139.

6.5. | Testul de excreţie al fenolsulfonftaleinei (roşu fenol)

Fenolsulfonftaleina administrată i.v., este legată de proteinele plasmatice. Pentru acest motiv, în concentraţie scăzută, nu este filtrată glomerular, fiind eliminată activ la nivelul celulelor tubulare şi constituind o măsură a funcţiei acestora.

Procedeu. Cu 24 de ore înainte de începerea testului, sînt suprimate medicamentele care utilizează aceiaşi transportori: sulfamide, penicilină, diuretice, atropina etc. Cu 20 minute înaintea procedeului, se dă pacientului 250—400 *ml* apă sau ceai neîndulcit. În momentul începerii se evacuează vezica şi se păstrează urina pentru *Uo* (martor). Imediat se injectează i.v. conţinutul unei fiole de PSP (6 *mg*/1 *ml*) diluat în aproximativ 5 *ml* ser fiziologic, avînd grijă să spălăm cu acest ser fiola şi să facem o administrare cantitativă. La 15 minute şi 60 minute de la injecţie, se recoltează cele 2 probe de urină U_1 şi U_2.

Dozarea PSP în urină, după Rowntree — Geraghty.

Principiu PSP este un colorant care în mediu alcalin devine roşu-violet. Dozarea lui se bazează pe această proprietate. Intensitatea culorii este proporţională cu concentraţia.

Reactivi. 1) Soluţie roşu de fenol 0,6 g% repartizat în fiole conţinînd 1 *ml* soluţie sterilă, pentru administrare i.v.: 0,3 g roşu fenol se dizolvă în 50 *ml* soluţie clorură de sodiu 0,75% adăugînd 0,8 *ml*

NaOH 2*N*. Se filtrează prin filtru Seitz, se repartizează în fiole cîte 1 *ml*, se sterilizează. *2*) Standard PSP corespunde aceleiaşi concentraţii, 0,6 g% preparat în aceleaşi condiţii, dar fără înfiolare şi sterilizare. *3*) NaOH 10%.

Tehnica. În probele de urină *Uo* (martor) U_1 recoltat la 15 minute şi U_2 recoltat la 60 minute (direct în borcanele în care s-a făcut recoltarea) se pun cîte 3 *ml* NaOH 10%. Se transvazează probele fiecare în cîte un cilindru de 1000 *ml*, se completează cu apă distilată pentru citirea fotometrică, sau cu apă de robinet pentru citirea la scara vizuală. Citirea se face după 5—10 minute de la adăugarea hidroxidului, la 540 *nm* probele U_1 şi U_2 faţă de *Uo*, sau la scara vizuală, prin comparaţie directă.

Curba. La 1 *ml* standard PSP (6 *mg*) se adaugă 3 *ml* NaOH 10%, se completează la 1000 *ml* cu apă distilată. Această soluţie corespunde unei eliminări de 100% faţă de cantitatea administrată (6 *mg*). Din această soluţie se scot cîte 5, 10, 20, 40, 60 *ml* şi se completează la 100 *ml* apă distilată. Probele standard vor corespunde succesiv unor concentraţii procentuale de 5, 10, 20, 40, 60%. Sînt citite la 540 *nm* (sau filtru S_{52}) faţă de apă şi se trasează curba exprimînd procente eliminate în abscisă şi extincţiile în ordonată.

Probele standard pot fi închise în eprubete de capacitate aproximativ 20 *ml*, constituind scara vizuală a cărei valoare se păstrează aproximativ şase luni. Citirea la scara vizuală necesită introducerea soluţiei de citit în eprubete de aceeaşi dimensiune cu eprubetele scării vizuale. Aprecierea eliminării procentuale se face direct.

Calcul

Eliminarea procentuală 15 minute = valoarea corespunzătoare probei U_1, citită pe curbă sau la scara vizuală.

Eliminarea procentuală 60 minute = valoarea corespunzătoare probei $U_1 + U_2$

Valori normale

Procente PSP eliminat la 15 minute = peste 25%

Procente PSP eliminat la 60 minute = peste 60%

BIBLIOGRAFIE

Balint, P., *Klinikai Laboratorium Diagnostika*, Ed. Medicina, Budapesta, 1968.

Scanned with OKEN Scanner

EXAMENUL CALCULILOR URINARI

Stabilirea compoziţiei calculilor urinari se face pe baza solubilităţii şi a diverselor reacţii de culoare ale componentelor.

Reactivi. *1*) Reactivul Nessler (vezi pag. 316). *2*) Acid azotic pur. *3*) Amoniac pur. *4*) NaOH 10 *n*. *5*) Reactiv nitrosulfurico-molibdic. Se prepară două soluţii, care se conservă nelimitat.

Soluţie A: 35 *g* azotat de amoniu, 33 *ml* HNO_3 ($d = 1{,}38$), 7,5 *ml* H_2SO_4 conc., apă distilată ad 100 *ml*. Soluţia B: 50 *g* molibdat de amoniu, 5 *ml* amoniac conc. şi apă distilată ad 500 *ml*. În momentul întrebuinţării se amestecă un volum de soluţie A şi 5 volume de soluţie B. *6*) Soluţie roşu de metil: se amestecă într-un mojar 0,1 *g* roşu de metil cu 12,5 *ml* alcool etilic 95° pînă la dizolvare, apoi se adaugă 12,5 *ml* apă distilată. Soluţia de lucru este diluată în felul următor: un volum soluţie preparată ca mai sus şi 9 volume de apă distilată. Virajul este roşu la *pH* 4,4 şi galben la *pH* 6,0. *7*) Acetat de Na 20%. *8*) Soluţie apoasă saturată de oxalat de amoniu (cca 4%). *9*) Na_2HPO_4 cristalizat, soluţie 5%. *10*) Reactiv Courtonne (vezi pag. 401). *11*) Reactiv Legal: 10 *ml* soluţie proaspătă de nitroprusiat de sodiu 10% şi 10 *ml* acid acetic cristalizabil.

Tehnica. I. *Caracterele morfologice* sînt foarte utile pentru orientarea cercetării: culoare galbenă-ocru, calculi denşi, de formă globoidă, duri, acid uric; culoare gri-ocru, pămîntii, uraţi (în special de amoniu); culoare neagră, brună ori verzuie (din cauza hemoragiilor pe care le produc), aspect mamelonat (calculi murali) densitate pronunţată, oxalat de calciu; culoare albă, mai mult ori mai puţin gri cu aspect cristalin (fosfat amoniaco-magnezian) sau pămîntiu omogen (fosfaţi calcari şi magnezieni); culoare albă-gălbuie sau verzuie, uşori şi cu aspect ciros, cistină.

II. *Identificarea chimică:* se vor face întîi reacţiile sugerate de aspectul morfologic.

1. Acid uric şi uraţi

a) Reacţia murexidului. Într-un creuzet mic de porţelan se ia o bucată de calcul, se adaugă 2—3 picături acid azotic şi 2—3 picături apă distilată. Se evaporă blînd, fără supraîncălzire. Peste reziduul roşu

Scanned with OKEN Scanner

obţinut se adaugă o picătură de amoniac pur, (sau NaOH 33%). Dacă reziduul devine violet, reacţia este pozitivă, indicînd prezenţa acidului uric.

b) Caracterizarea bazelor legate de acid uric. Dacă prin calcinarea unei bucăţi de calcul nu se obţine un reziduu notabil, este vorba de un calcul din acid uric pur ori din urat de amoniu (în acest ultim caz se obţine o reacţie pozitivă, pentru amoniac. Dacă se obţine un reziduu este vorba de urat de sodiu sau potasiu).

2. Săruri de amoniu

Se decelează uşor prin culoarea galbenă-portocalie obţinută, introducînd un fragment de calcul în 1 *ml* reactiv Nessler. Evidenţierea amoniului se poate efectua şi prin reacţia Berthelot (vezi pag. 140 şi 146).

3. Carbonaţi, fosfaţi şi oxalaţi (de Ca şi Mg)

Pentru identificare se fac succesiv următoarele probe:

a) La un fragment de calcul mojarat se adaugă 2—3 picături HNO_3 şi 2—3 picături apă distilată. Dacă se produce efervescenţă calculul este din carbonat.

b) Se aduce soluţia de la punctul a) la fierbere, apoi se aduce la volum de 3 *ml* cu apă distilată. Se ia 1 *ml* din soluţie şi se adaugă 6 *ml* reactiv nitrosulfuricomolibdic. Se aduce la fierbere. Dacă se obţine un precipitat galben este vorba de fosfaţi.

c) Restul soluţiei se tratează cu 2 *ml* acetat de Na 20% şi o picătură roşu de metil. Dacă este nevoie se ajustează *pH*-ul pînă la culoarea roşie a indicatorului. Apariţia unui precipitat denotă oxalat de calciu. Se filtrează dacă este necesar. Se aduce la fierbere şi se adaugă 1 *ml* oxalat de amoniu saturat. Dacă apare un precipitat este prezent calciul.

d) Se filtrează şi se verifică faptul că filtratul nu mai precipită cu oxalat de amoniu, apoi se adaugă: 2 picături fenolftaleină, amoniac concentrat pînă la viraj roz şi 10 picături Na_2HPO_4 5%. Un precipitat cristalin denotă prezenţa magneziului.

4. Cistina

Se ia un fragment de calcul, se adaugă 1 *ml* apă distilată şi 2 picături NaOH 10 *n*. Se fierbe şi se împarte lichidul obţinut în două porţiuni: la o porţiune se adaugă 1 picătură reactiv Courtonne; un precipitat negru de PbS denotă prezenţa cistinei, la cealaltă porţiune se adaugă 2 picături reactiv Legal; coloraţia violetă denotă de asemenea prezenţa cistinei.

Scanned with OKEN Scanner

Interpretare

Calculii urinari apar în litiaza urinară cu următoarea frecvență relativă:

Oxalat de Ca	34,2%
Oxalat de Ca + fosfat de Ca	26,2%
Acid uric	18,8%
Fosfat de Ca	9,7%
Oxalat de Ca + acid uric	4,5%
Fosfat amoniaco-magnezian	2,2%
Carbonat de Ca	2,2%
Cistina	1,7%

BIBLIOGRAFIE

Fleury, P., *Fiches techniques de chimie biologique*, Urine 37, 1955, Ed. Véga, Paris.; Devaux, G., Crockett, R., Jouzier, R., Brachet—Liermain, A., Ruffie, A., *Choix de techniques de biochimie clinique*, Gauthier—Villars, Paris, 1970.; Cottet, P., Pathol. et Biol., 1959, 7, p. 1975.

Scanned with OKEN Scanner

SUCUL GASTRIC ȘI DUODENAL

1. ANALIZA SUCULUI GASTRIC

Sucul gastric este un lichid incolor, limpede, acid, fără miros. În cazuri patologice, mirosul este acru, putred sau rînced. Cantitatea secretată este variabilă, fiind influențată de cantitatea și natura alimentației.

Densitatea este cuprinsă între 1,002—1,010, iar *pH*-ul între 0,92—2,2. În compoziția sucului gastric intră substanțe minerale: acidul clorhidric, cloruri de sodiu, potasiu, amoniu, fosfați de calciu și magneziu, sulfocianuri, precum și substanțe organice: enzime (pepsina, labfermentul, lipazele), acid lactic, citric, mucine.

Pentru clinică are importanță determinarea aciditățiii sucului gastric care variază însă în funcție de modul de stimulare a secreției gastrice. Procedeurile de stimulare a secreției gastrice și obținere a sucului gastric sînt foarte numeroase și încă insuficient standardizate. Rezultatele obținute prin diverse prînzuri de probă, prin excitarea cu alcool sau cu cofeină dau răspunsuri variabile și nereproductibile. Mai fundamentate din punct de vedere fiziologic sînt probele farmacologice folosindu-se agenți care stimulează fie direct masa celulelor secretoare (gastrina, histamina) fie indirect, prin intermediul vagului (insulina).

1.1. | Obținerea sucului gastric și stimularea secreției gastrice

Proba Leporski. Subiectul va evita cu cel puțin trei zile înainte de efectuarea probei medicamente ca atropina, ganglioplegice, acetilcolina, corticoizii, ACTH, fenilbutazone sau orice altă substanță care ar putea modifica secreția gastrică. Dimineața, după un post alimentar de cel puțin 12 ore, se introduce sonda Einhorn a cărei poziție este bine să fie controlată radiologic, oliva radioopacă trebuind să fie în dreptul vertebrei L_2. Se extrage conținutul stomacului alcătuind lichidul de stază (bazal) și se introduce prin sondă 300 *ml* soluție alcoolică 5% (eventual colorată cu 3 picături albastru de metilen 2%.) După 25 minute se evacuează din nou tot conținutul gastric (aproximativ 70—80 *ml*). În continuare se fac 4 extracții totale la interval de cîte 15 minute. Suma volumelor de lichid obținute constituie efortul secretor pe oră fiind de 70—80 ml, la normali. Se dozează apoi în fie-

Scanned with OKEN Scanner

care probă acidul clorhidric liber şi aciditatea totală. Proba poate fi extinsă la 2 ore (8 recoltări din 15 în 15 minute) iar în locul alcoolului se poate folosi cofeina (0,25 *g* cofeină pură sau 0,5 *g* cofeină natriu benzoică) dizolvată în 200 *ml* apă şi introdusă prin sondă. Aşa cum s-a mai arătat această probă dă rezultate puţin reproductibile şi poate fi folosită doar ca probă de orientare.

Testul maximal cu histamină (*Kay*). Se vor lua aceleaşi măsuri de precauţie ca şi în proba descrisă anterior, iar după introducerea sondei se aspiră conţinutul gastric din 2 în 2 minute colectîndu-se sucul gastric în fracţiuni separate pe cîte o perioadă de 15 minute, timp de o oră. Aceste patru fracţiuni reprezintă secreţia bazală. Se administrează apoi subcutanat fosfat acid de histamină 0,04 *mg/kg* (corespunzînd la 0,014 *mg* histamină/*kg*) şi se continuă aspiraţia tot pe timp de o oră; sucul gastric obţinut fiind repartizat în alte 4 fracţiuni, fiecare la interval de 15 minute. Se va avea grijă ca extracţia sucului gastric să fie cît mai completă. Este absolut necesar ca înainte cu 30 minute de la administrarea histaminei să se injecteze intramuscular un histaminic de sinteză (100 *mg* romergan sau feniramin) care nu influenţează efectul secretor al histaminei dar previne fenomenele vasculare neplăcute cauzate de dozele mari de histamină. Testul va fi efectuat de un medic. În locul histaminei se poate folosi histalog, un analog de histamină, în doză de 1,7 *mg/kg* care stimulează secreţia gastrică dar nu are efectele vasculare ale histaminei.

La cele 8 fracţiuni extrase (4 înainte de histamină şi 4 după histamină) se măsoară cu precizie volumele şi se dozează aciditătile.

Testul cu insulină (*Hollander*) se efectuează în special pentru a controla efectul vagotomiei. Bolnavului, care a respectat condiţiile impuse de explorare gastrică (vezi mai sus), i se introduce o sondă în stomac şi i se recoltează sînge pentru determinarea glicemiei. Se injectează apoi intravenos 15—20 unităţi insulină cristalizată (în funcţie de greutatea subiectului) colectîndu-se ulterior sucul gastric, în 8 fracţiuni, pe perioade de cîte 15 minute (durata probei două ore). În paralel cu recoltările de suc gastric se recoltează şi 8 probe de sînge pentru determinarea glicemiei. Pentru ca rezultatele examinării sucului gastric să fie valabile, e nevoie ca glicemia să scadă la valori în jur de 50 *mg*/100 *ml*.

1.2. Determinarea acidităţii sucului gastric

Se distinge aciditatea actuală sau *pH*-ul şi aciditatea de titrare

Scanned with OKEN Scanner

1.2.1. | DETERMINAREA pH-ULUI

Principiu. *pH*-ul sucului gastric se determină cu ajutorul indicatorului cristal violet, care, la *pH*-uri cuprinse între 1,1 şi 2,5 prezintă culoarea verde-albastră, albastră, albastră-violetă, pînă la violetă. Culoarea sucului gastric la care se adaugă cristal violet (violet de gentiana) se compară cu o scară de *pH*.

Reactivi. *1*) HCl 0,1 *n*. *2*) Soluţia cristal violet 0,2% *g* în apă.

Tehnica. Se iau 7 eprubete de diametru egal şi se adaugă acid clorhidric 0,1 *n* şi apă bidistilată după tabelul următor; se adaugă apoi în fiecare eprubetă cîte 0,5 *ml* soluţie de cristal violet. Culorile corespund *pH*-ului indicat.

Se iau 10 *ml* suc gastric filtrat într-o eprubetă identică cu cele de mai înainte, se adaugă 0,5 *ml* soluţie de indicator şi se compară culoarea cu scara de *pH*. Adăugarea soluţiei de cristal violet se va face în toate eprubetele în acelaşi timp, fiindcă intensitatea culorii scade repede.

Eprubeta	I	II	III	IV	V	VI	VII
HCl 0,1 n (ml)	6,35	4,0	2,5	1,6	1,0	0,63	0,4
Apă bidistilată (ml)	3,65	6,0	7,5	8,4	9,0	9,37	9,6
Sol. cristal violet (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
pH obţinut	1,1	1,3	1,5	1,7	1,9	2,1	2,3

1.2.2. | DETERMINAREA ACIDITĂŢILOR DE TITRARE

Principiu. Aciditatea de titrare este compusă din aciditatea liberă, datorită acidului clorhidric liber, şi aciditatea combinată sau legată, datorită acidului clorhidric şi altor acizi legaţi de diferite substanţe, în special aminoacizi sau proteine. Suma acidităţii libere şi a celei legate reprezintă aciditatea totală.

Aciditatea liberă se determină prin titrare cu NaOH 0,1 *N* în prezenţa dimetilaminoazobenzolului (reactiv Töpfer) iar aciditatea totală în prezenţa fenolftaleinei ca indicator.

Reactivi. *1*) Indicator Linossier: 0,25 *g* dimetilaminoazobenzol, 1 *g* fenolftaleină şi alcool ad 100 *ml*. *2*) Soluţie NaOH 0,1 *N*.

Tehnica. Într-un pahar Erlenmeyer se pipetează 5 *ml* suc gastric şi se adaugă 10—15 *ml* apă distilată şi 2 picături de indicator Linossier. Dacă sucul gastric conţine acid clorhidric liber apare o coloraţie roz, datorită dimetilaminoazobenzolului. Se titrează cu NaOH 0,1 *N*, pînă cînd culoarea soluţiei virează la portocaliu foarte deschis. Se notează cu A numărul de *ml* hidroxid întrebuinţaţi. Se continuă adăugarea NaOH pînă cînd culoarea virează la roz (virajul fenolftaleinei).

Scanned with OKEN Scanner

Se notează cu B numărul de mililitri NaOH 0,1 *N* necesari pentru obținerea acestui viraj.

Calcul și exprimarea rezultatelor. Numărul de *ml* de NaOH 0,1 *N* utilizați pînă la virajul în portocaliu (A *ml*) servește pentru calculul acidității libere, iar numărul de *ml* NaOH 0,1 *N* adăugat pînă la virajul final (A+B *ml*) servește pentru calculul acidității totale, B reprezentînd aciditatea legată.

Exprimarea rezultatelor poate fi efectuată sub formă de concentrație a acidității sau sub formă de debit clorhidric în acest caz ținîndu-se cont și de volumul secretat. Concentrațiile de HCl se exprimă sub formă de unități clinice Jaworski sau *mEq/l.* Unitățile clinice reprezintă numărul de mililitri NaOH 0,1 *N* necesari pentru neutralizarea acidității în 100 *ml* suc gastric.

Înmulțind numărul de *ml* NaOH, necesari pentru neutralizarea acidității din 5 *ml* suc gastric, cu 20 se obține rezultatul în unități clinice. Astfel:

A *ml* × 20 = aciditate liberă în unități clinice

(*A* + B) *ml* × 20 = aciditate totală în unități clinice

B *ml* × 20 = aciditate combinată în unități clinice

Întrucît, numărul de mililitri NaOH 0,1 *N* necesari pentru neutralizarea acidității din 100 *ml* suc gastric este egal cu numărul de mililitri NaOH 1 *N* necesari pentru neutralizarea acidității din 1000 *ml* suc gastric, unitățile clinice corespund noțiunii de *mEq/l* (1 unitate clinică = 1 *mEq/l*).

În unele laboratoare se mai utilizează încă exprimarea sub formă de grame HCl/1000 *ml.* Ținînd cont că un miliechivalent de HCl este egal cu 0,0365 g, transformarea unităților clinice (*mEq/l*) în *g* HCl se face înmulțindu-se valoarea în unități clinice cu factorul 0,0365.

Cea mai corectă exprimare este cea care ține cont nu numai de concentrația de HCl dar și de volumul de suc gastric secretat și de intervalul de timp în care a avut loc secreția. Se obține astfel debitul clorhidric în *mEq/h* notat internațional cu QH^+. Pentru a afla această valoare se calculează separat debitul clorhidric în fiecare din fracțiunile recoltate pe cîte un interval de 15 minute și se face apoi suma acestor valori.

$$\text{Debit clorhidric/15 } min = \frac{\text{Aciditatea liberă în } mEq/1 \times \textit{Vol. fracțiunii (ml)}}{1000}$$

Debit clorhidric în *mEq/h* = Suma debitelor clorhidrice în cele patru fracțiuni colectate la intervale de 15 *min.*

Valori normale şi interpretare

Valorile normale ale aciditătii gastrice variază în funcţie de absenţa sau prezenţa stimulării precum şi de modalitatea de stimulare.

Secreţia bazală (nestimulată) prezintă concentraţii ale aciditătii libere de 0—30 *mEq/l*, aciditatea totală fiind de 10—50 *mEq/l*. Volumul de suc gastric secretat în condiţii bazale în decurs de o oră este de aproximativ 60—70 *ml*, iar debitul clorhidric este în medie de 2 *mEq*/oră.

La 40—60 minute după stimularea cu alcool sau cofeină aciditătile cresc la valori de 20—50 *mEq/l* (aciditatea liberă) şi respectiv 50—70 *mEq/l* (aciditate totală).

Prin stimularea cu histamină concentraţiile aciditătii libere ajung la valori de 50—120 *mEq/l* iar aciditatea totală e de 60—140 *mEq/l*. Volumul de suc gastric secretat în decurs de o oră este de aproximativ 250 *ml*, iar debitul clorhidric atinge valori medii de 20 *mEq*/oră.

Date fiind limitele destul de largi de variaţie a valorilor normale interprearea modificărilor patologice ale aciditătilor gastrice trebuie efectuată cu multă rezervă.

Constatarea unei aclorhidrii histaminorezistente sugerează însă o atrofie a mucoasei gastrice aşa cum există în anemia de tip Biermer şi în unele forme de neoplasm gastric.

Creşterea secreţiei bazale la 300—500 *ml*/oră şi a debitului clorhidric bazal la 60 *mEq*/oră şi o creştere puţin exprimată a secreţiei clorhidrice după stimularea cu histamină (doar +40% faţă de valorile bazale) este caracteristică pentru sindromul Zollinger—Elison (adenom pancreatic care secretă gastrină).

În ulcerul duodenal se constată o creştere moderată a secreţiei bazale de acid clorhidric (4 *mEq*/oră) şi o creştere exprimată a răspunsului la diverşi stimuli (după histamină debitul clorhidric ajunge în medie la 34 *mEq*/oră).

În ulcerul gastric modificările aciditătii sînt necaracteristice.

Observaţii. Tendinţa modernă în gastro-enterologie este să se renunţe la noţiunile de aciditate liberă şi aciditate totală, efectuîndu-se o singură titrare pînă la virajul indicatorului roşu fenol la *pH* 7. Pentru titrare se procedează în acelaşi mod folosindu-se însă 2—3 picături dintr-o soluţie alcoolică 1% de roşu fenol şi titrîndu-se pînă la apariţia unei coloraţii roşii portocalii. Secreţia clorhidrică a stomacului se exprimă astfel printr-o singură valoare, calculîndu-se apoi debitul clorhidric pe oră.

De notat însă că în tulburări de evacuare ale stomacului, creşterea diferenţei între aciditatea totală şi aciditatea liberă poate avea valoarea diagnostică şi uneori sugerează producţia de acid lactic la nivelul stomacului.

Scanned with OKEN Scanner

1.3. Componenţi anormali ai sucului gastric

1.3.1. EVIDENŢIEREA ACIDULUI LACTIC (REACŢIA UFFELMANN)

Principiu. Reacţia se bazează pe trecerea fenolatului feric (culoare violetă) în lactat feric (culoare galbenă).

Reactivi. 1) Soluţie fenol 1%. *2*) Soluţie clorură ferică 3%.

Tehnica. Într-o eprubetă se iau 2 *ml* fenol 1% şi 1—2 picături clorură ferică. Apare o culoare albastră-violetă (fenolat feric). Se adaugă sucul gastric picătură cu picătură. Apariţia unei culori galben-verzui (lactat feric) indică prezenţa acidului lactic. În lipsa acidului lactic se produce doar o decolorare uşoară a soluţiei.

Interpretare. Acidul lactic nu există în mod normal în sucul gastric. El apare prin infectarea conţinutului gastric, în cazul în care în stomac lipseşte acidul clorhidric. Prezenţa lui ne indică o hipo- sau aclorhidrie.

1.3.2. EVIDENŢIEREA SÎNGELUI

Se iau într-o eprubetă cîţiva *ml* suc gastric filtrat, se fierb 2 *min* pentru inactivarea oxidazelor şi apoi se practică una din reacţiile descrise la urină.

1.3.3. ANALIZA ENZIMELOR

Determinarea pepsinei nu prezintă importanţă practică, deoarece producţia de pepsină este paralelă cu cea de acid clorhidric. O metodă cantitativă şi reproductibilă de dozare a pepsinei este descrisă de Babaskin.

Pentru evidenţierea labfermentului se iau 1—2 *ml* suc gastric care se neutralizează cu NaOH 0,5% în prezenţa turnesolului. Se iau în altă eprubetă 10 *ml* lapte proaspăt nefiert, se adaugă 10 picături suc gastric neutralizat şi se lasă la 37°C timp de 10—30 *min*, cînd laptele trebuie să coaguleze. Pentru control se face o probă în care se adaugă suc gastric neutralizat fiert, această probă nu trebuie să coaguleze.

BIBLIOGRAFIE

Manta, I., Ciplea, A., *Metodele laboratorului clinic*, Cartea Românească, Cluj, 1947. Fodor, O., Popescu, Şt., Urcan, S., *Boala ulceroasă-fiziopatologie şi patogeneză*, Editura Academiei, Bucureşti, 1968. Babaskin, P. M., Lab. Delo, 11 (1965), 406.

Scanned with OKEN Scanner

2. SUCUL DUODENAL ŞI SECREŢIA PANCREASULUI EXOCRIN

Lichidul obţinut prin tubajul duodenal reprezintă un amestec de bilă, suc pancreatic şi lichid de secreţie al glandelor mucoasei duodenale. La acestea se adaugă cu intermitenţă sucul gastric. Tubajul duodenal se foloseşte în clinică în special pentru examenul macroscopic şi microscopic al bilei. Recent s-au perfecţionat metode biochimice de explorare a pancreasului pe baza examinării secreţiei de bicarbonaţi şi de enzime pancreatice în urma stimulării glandelor acinoase cu ajutorul hormonilor intestinali: secretina şi pancreozimina, administrate în perfuzie intravenoasă. În acest scop se introduce bolnavului à jeun o sondă dublă gastrică şi duodenală, avînd eventual un balon de obstrucţie a duodenului. Prin aspirarea continuă a sucului gastric se evită contaminarea sucului duodenal cu suc gastric. Cînd sucul duodenal obţinut prin sonda duodenală devine clar şi alcalin se recoltează o porţiune de suc pe o perioadă de 20 minute. După obţinerea acestei probe bazale se injectează intravenos 90 unităţi pancreozimină dizolvată în 18 *ml* ser fiziologic şi se recoltează sucul pancreatic bogat în enzime secretat în următoarele 10 minute. După aceste 10 minute se injectează, tot intra venos, 80 unităţi secretină dizolvate în 16 *ml* ser fiziologic, şi se recoltează apoi sucul duodenal (în mare măsură suc pancreatic) în şase probe pe cîte o perioadă de 10 minute. Se determină în fiecare din cele 8 probe (secreţia bazală, o probă post-pancreozimină şi 6 probe post-secretină) volumul de lichid, conţinutul în bicarbonaţi şi activitatea enzimatică (amilază, lipază).

2.1. Dozarea amilazei în sucul duodenal (Metoda Smith şi Roe, modificată)

Principiul metodei a fost expus anterior (vezi pag. 285).

Reactivi. *1*) Amidon 2%. *2*) Tampon fosfat *pH* = 7,1 (ambii reactivi au fost descrişi anterior, vezi pag. 286). *3*) Soluţie clorură de sodiu 3%. *4*) Soluţie de iod: se dizolvă 30 g iodură de potasiu în 40 *ml* apă distilată, adăugîndu-se apoi la soluţie *3* g iod metalic. Se agită flaconul închis cu dop rodat pînă la dizolvarea completă a iodului şi se aduce volumul la 1 litru cu apă distilată. *5*) HCl 1 *N*.

Tehnica. Pentru fiecare probă se pipetează în cîte o eprubetă 5 *ml* amidon, 3 *ml* tampon fosfat şi 1 *ml* soluţie NaCl şi se aduce temperatura la 37°C pe o baie de apă. Se adaugă apoi 1 *ml* din sucul duodenal diluat 1/500 cu apă distilată.

Martorul conţine 3 *ml* apă distilată în locul sucului duodenal diluat.

Scanned with OKEN Scanner

După o incubare de 30 minute la 37°C se opreşte reacţia enzimatică adăugîndu-se 2 *ml* HCl 1 *N* în probă (nu şi în martor).

Pentru dezvoltarea reacţiei de culoare a amidonului rămas nehidrolizat, 5 *ml* din amestecul de incubare de mai sus se trece într-un flacon de 250 *ml* conţinînd 2,5 *ml* HCl 1 *N*, 200 *ml* apă distilată şi 2 *ml* soluţie de iod (reactiv 4). Se procedează în acelaşi mod ca proba martor şi se aduce apoi volumul flacoanelor la 250 *ml*. Se amestecă bine şi se citesc extincţiile în probă şi martor faţă de apă distilată la 620 *nm* în cuve de 1 *cm*.

Calcul

$$\frac{E \text{ martor} - E \text{ probei}}{E \text{ martor}} \times 10 \times \text{diluţia sucului duodenal} = \text{activitatatea amilazică, în unităţi, pe } ml \text{ suc duodenal.}$$

Diluţia sucului pancreatic poate fi crescută la mai mult de 1/500 dacă activitatea amilazică este prea intensă.

Valori normale şi interpretarea. Concentraţia amilazei în sucul duodenal este de cîteva sute de ori mai mare decît în ser. Valorile de la acelaşi subiect oscilează însă între limite foarte largi în funcţie de starea de repaus respectiv de stimularea secreţiei pancreatice. De asemenea valorile diferă de la subiect la subiect. Pe de altă parte exprimarea valorilor activităţii amilazice sub formă de concentraţie nu ţine cont de variaţiile volumului de suc pancreatic. Astfel, pancreozimina produce un suc pancreatic de volum redus dar bogat în enzime pe cînd secretina produce un flux abundent dar mai diluat. Din acest motiv este mai corectă exprimarea sub formă de activitate amilazică pe o anumită perioadă secretorie. Debitul amilazic pe 70 minute în condiţiile de stimulare amintite mai sus (vezi pag. 468) este de peste 100.000 unităţi (după Sun, 1963). Recomandăm însă ca fiecare laborator să-şi stabilească valorile normale pe un lot propriu de subiecţi în condiţiile de recoltare şi de lucru accesibile. Calcularea debitului se face înmulţind numărul de mililitri suc pancreatic cu activitatea amilazică pe un mililitru.

Scăderea marcată a secreţiei pancreatice survine în atrofiile pancreasului exocrin sau în obstrucţia canalelor excretoare (neoplasm de cap de pancreas). Alături de scăderea debitului amilazic scade şi concentraţia de bicarbonaţi care la normali atinge valori de 69—126 *mEq/l*. Metodele de dozare a bicarbonaţilor au fost expuse anterior (vezi pag. 263).

BIBLIOGRAFIE

Sun, D. C. H., Gastroenterology, 44 (1963), p. 602. Smith, B. W. and Roe, J. H., J. Biol. Chem., 179 (1949), p. 53. Sokal, G., Bibl. Fac. Méd. Louvain (Belg.), 12 (1953), p. 101.

Scanned with OKEN Scanner

ALTE LICHIDE BIOLOGICE

1. LICHIDE DE PUNCŢIE. TRANSUDATE ŞI EXUDATE

Lichidele obţinute prin puncţie pleurală, pericardică sau peritoneală pot fi clasificate în transudate şi exudate.

Transudatele sînt lichide neinflamatorii, de culoare gălbuie pînă la verde deschis, cu reacţie uşor alcalină, cu densitatea 1,005—1,015 şi un conţinut în proteine sub 2,5 *g*/100 *ml*. Apar în insuficienţa cardiacă, nefroze, ciroze.

Exudatele sînt de obiceiu consecinţa unui proces inflamator (uneori tumoral), au o densitate de peste 1,018, un conţinut în proteine de peste 3 *g*/100 *ml* şi coagulează.

Lichidele de puncţie pot fi seroase, purulente, hemoragice, putride, chiloase sau chiliforme.

Examenul chimic al lichidelor de puncţie include investigarea proteinelor, lipidelor, a unor enzime (lacticodehidrogenază) şi a unor factori ai coagulării.

Examenul proteinelor poate fi efectuat calitativ (reacţia Rivalta) sau cantitativ.

Reacţia Rivalta. Într-un cilindru gradat se pun 100 *ml* apă distilată şi 2 picături acid acetic glacial şi se amestecă. Se lasă apoi să cadă o picătură din lichidul de analizat în coloana de apă acidulată. Reacţia pozitivă dată de exudate se caracterizează printr-o opalescenţă ca un fum de ţigară, care se produce pe traiectul picăturii. În cazul transudatelor reacţia este negativă.

Dozarea cantitativă a proteinelor se face prin metoda Lowry sau prin metoda biuretului (Gornall) efectuată direct pe lichid sau pe precipitatul cu acid percloric (vezi pag. 117 şi 399). Se poate efectua electroforeza proteinelor din lichid.

Examenul lipidelor se efectuează în cazul lichidelor pleurale sau peritoneale de aspect lactescent: chiloase, produse prin ruperea unor vase chilifere, bogate în lipide, sau chiliforme cînd aspectul lactescent e produs de degenerescenţa grăsoasă a unor celule inflamatorii exudate în pleură sau peritoneu.

Diferenţierea unui lichid chilos de unul chiliform poate fi efectuată cu ajutorul soluţiei Adam (0,3 *ml* amoniac conc. + 8,3 *ml* alcool 90° + 1,4 *ml* apă distilată + 10 *ml* eter etilic). Amestecîndu-se şi agitîndu-se într-o eprubetă un volum din lichidul lactescent de analizat cu două volume soluţie Adam se va produce o clarifiere în cazul

Scanned with OKEN Scanner

unui lichid chilos (solubilizarea lipidelor) în timp ce în cazul unui lichid chiliform (celule degenerate grăsos) lactescenţa persistă producîndu-se uneori un precipitat cazeos. Dozarea chimică a lipidelor după metodele descrise la pag. 175 confirmă o concentraţie crescută a acestora în lichidele chiloase.

Pentru studiul factorilor coagulării în lichidele biologice se indică recoltarea pe un anticoagulant.

Diferenţierea revărsatelor seroase în funcţie de etiologia lor întîmpină dificultăţi întrucît conţinutul în proteine este similar în revărsatele tumorale şi în cele inflamatorii iar reacţia Rivalta este de regulă pozitivă în ambele tipuri de revărsate. De asemenea creşterea lacticodehidrogenazei se constată atît în revărsatele inflamatorii cît şi în cele tumorale.

Aceste două tipuri de revărsate seroase diferă însă în privinţa comportării raportului între procentul de α_2 globuline în revărsat şi ser precum şi în privinţa comportării inhibitorilor fibrinolizei. Aceste diferenţe se datoresc mecanismului diferit de formare a revărsatelor în cele două condiţii patologice. Astfel, în inflamaţii ale seroasei se produc leziuni ale endoteliilor astfel încît trecerea factorilor plasmatici (inclusiv a inhibitorilor fibrinolizei) se face neselectiv. În cazul neoplaziilor, mecanismul formării revărsatelor constă în primul rînd într-o perturbare a resorbţiei pe cale limfatică a lichidului din seroase şi în special a proteinelor, în urma prinderii ganglionilor limfatici de către procesul tumoral, iar endoteliile sînt de regulă intacte.

Reproducem în tabelul 28 criteriile de diferenţiere a revărsatelor seroase în funcţie de etiologia lor.

TABEL 28

CÎTEVA CRITERII DE LABORATOR PENTRU DIFERENŢIEREA REVĂRSATELOR SEROASE

Tipul de revărsat	Transudat (ciroză, nefroză, insuficienţă cardiacă)	Exudat inflamator	Revărsat tumoral
Proteine totale (*g*/100 *ml*)	sub 3 (mai des sub 2)	4—6	2—6
Raport $\frac{\%\ \alpha_2 \text{ globuline în revărsat}}{\%\ \alpha_2 \text{ globuline în ser}}$	sub 0,5	aprox. 1	sub 0,7
Activitate LDH	±	+++	+++
Inhibitorii fibrinolizei	—	+++	—
Prezenţa factorilor complexului protrombinic (Timp Quick)	—	±	±

Activitatea lacticodehidrogenazei (LDH) este adeseori mai crescută în revărsat decît în ser în cazul neoplaziilor. Tehnica determinării LDH este expusă la pag. 322, iar testarea inhibitorilor fibrinolizei la pag. 375. De notat că micile cantităţi de inhibitori ai fibrinolizei prezenţi în revărsatele tumorale sînt de cîteva ori mai scăzuţi decît în serul bolnavului (calculaţi pentru o aceeaşi cantitate de proteine).

În lipsa reactivilor indicaţi la pag. 375 se poate încerca efectul inhibitor al revărsatului în comparaţie cu serul (în diluţii) asupra fibrinolizei unui cheag de euglobuline (vezi pag. 356) cu timp scurt de liză (provenite de la un cirotic).

BIBLIOGRAFIE

Baciu, I., Cucuianu, M., *Medicina Internă*, 14, 1961, 237. Baciu, I., Cucuianu, M., *Physiologia Bohemoslovenica*, 12, 1963, 233. Fleischer, G. A., Bartholomew, L. G., Cain, I. C., Rovelstand R. A., Gastroenterology, 37, 1959, 325.

2. | DOZAREA CLORULUI ÎN SECREŢIA SUDORALĂ

Se practică în diagnosticul fibrozei chistice a pancreasului (mucoviscidozei). Spre deosebire de subiecţii normali la care sudoarea este hipotonă, avînd un conţinut de cloruri mai scăzut decît serul, la bolnavii cu mucoviscidoză se elimină o cantitate crescută de cloruri prin lichidul sudoral.

Principiu. Se injectează o substanţă parasimpaticomimetică şi apoi se recoltează sudoarea pe o bucată de tifon cîntărită în prealabil. Se dozează clorul prin metoda Schales şi Schales, prin titrare cu azotat mercuric în prezenţă de difenilcarbazonă.

Material necesar. 1) Seringă de 1—2 *ml*, cu ac de injecţie intradermică. *2*) O foaie de polietilenă de 10 × 10 *cm*, spălată cu apă bidistilată şi uscată, bandă de lipit. *3*) Flacon cu apă distilată. *4*) Flacon cu eter. *5*) O fiolă de pilocarpină sau altă substanţă parasimpaticomimetică. *6*) Reactivii pentru dozarea clorului (vezi metoda Schales şi Schales la ser). *7*) Se pregătesc mai multe comprese de tifon de 8 × 8 *cm*, care se spală bine cu apă distilată şi se verifică la ultima spălare absenţa clorului (absenţa precipitării cu $AgNO_3$ în mediu azotic). Înainte de practicarea testului se pune cu penseta una din comprese într-un pahar (în prealabil spălat cu apă distilată şi uscat), se acoperă cu o foaie subţire de polietilenă legată pe gîtul paharului, cu cauciuc şi se cîntăreşte cu o precizie de 0,1 *mg*.

Tehnica. 1) Bolnavul nu trebuie să fie à jeun. Se spală de mai multe ori pielea abdomenului cu apă distilată, apoi se usucă şi se

Scanned with OKEN Scanner

şterge cu eter. Operatorul se spală cu apă distilată pe mîini şi apoi injectează intradermic 0,5 *ml* din fiola de pilocarpină, la cîţiva *cm* sub ombilic. Se usucă pielea la locul injecţiei, apoi se aşază pe locul de injectare compresa, din paharul tarat. Se acoperă cu polietilenă, se lipesc marginile cu atenţie, cu bandă adezivă, care trebuie să adere bine la piele. Se creează astfel un spaţiu închis ermetic. Se lasă compresa exact o oră, apoi se desface foaia de polietilenă într-o parte, se scoate repede compresa, se introduce în pahar şi se acoperă paharul ca la început.

2) Se cîntăreşte paharul cu compresa cu o precizie de 0,1 *mg* şi prin diferenţă faţă de prima cîntărire se obţine cantitatea de sudoare care s-a recoltat într-o oră.

3) Cu ajutorul unei pense se plasează compresa într-un pahar de plastic şi se spală de mai multe ori cu apă distilată, golind apele de spălare într-un alt pahar. Se dozează clorul din întreg volumul prin metoda descrisă la ser.

Soluţia de azotat mercuric este ajustată în aşa fel ca 2 *ml* de reactiv să corespundă la 1 *mg* NaCl (după cum s-a descris la ser, 2 *ml* din soluţia de azotat mercuric exact 0,01 *n* sînt echivalenţi cu 0,02 *mEq* NaCl, adică 1,170 *mg* NaCl; pentru a uşura calculul se face ajustarea soluţiei de azotat mercuric astfel ca 2 *ml* să corespundă la 1 *mg* NaCl).

Calcul. Dacă *n* este numărul de *ml* azotat mercuric utilizaţi la titrare, iar *g* este greutatea sudorii în *mg*:

$$\frac{n \times 1000}{2 \times g} = mg \text{ NaCl}/kg \text{ sudoare}$$

Raportul Cl/NaCl fiind 0,606, cantitatea de clor va fi:

$$\frac{n \times 1000 \times 0{,}606}{2 \times g} = mg/\text{Cl}/kg \text{ sudoare}$$

Rezultatul este convertit pe urmă din *mg* în *mEq/kg* sudoare (vezi tabelul la anexe).

Observaţii. 1) Este necesar să se obţină cel puţin 100 *mg* sudoare, în caz contrar se repetă proba după cîteva zile. În medie se obţin 300—500 *mg* sudoare. *2*) Cel mai adesea se observă erori în plus prin: declorurarea insuficientă a compreselor: nespălarea pielii abdomenului sau a mîinilor operatorului; lipsa de etanşeitate a patratului de polietilenă sau aerare prelungită a compresei pînă la introducerea în paharul de cîntărire. *3*) Dozările de clor pot fi efectuate şi cu alte metode. *4*) Se poate efectua şi o dozare de sodiu, a cărui creştere în lichidul sudoral e paralelă cu eliminările de clor.

Scanned with OKEN Scanner

Interpretare. Testul este negativ la subiecţii normali, sub 60 *mEq* Cl/*kg* sudoare; dubios în mucoviscidoză, la subiecţi heterozigoţi, 60—80 *mEq*/*kg* sudoare; pozitiv în mucoviscidoză, la subiecţi homozigoţi, peste 80 *mEq* Cl/*kg*.

BIBLIOGRAFIE

Gallet, I. P., Lestradet, H., Rev. praticien 17, 1967, p. 3457. Devaux, G., Crockett, R., Jouzier, R., Brachet-Liermain, A., Ruffie, A., *Choix de techniques de biochimie clinique*, Gauthier-Villars, Paris, 1970.

Scanned with OKEN Scanner

ANALIZA MATERIILOR FECALE

Din cele 150—200 g materii fecale evacuate zilnic, 2/3 sînt reprezentate de: celule epiteliale ale tubului digestiv şi produse rezultate din digestia microbiană a enzimelor digestive, iar 1/3 sînt constituite de substanţe alimentare nedigerate sau incomplet digerate şi microbi intestinali. Conţinutul hidric al materiilor fecale se ridică pînă la 78%.

Culoarea normală a scaunului este brună, datorită stercobilinei, formate, în colonul transvers, din stercobilinogen (sub acţiunea putrefacţiei bacteriene), care la rîndul său este produs prin transformarea bilirubinei la nivelul cecului. Scaunele diareice, ileale, sînt galben-aurii; uneori în contact cu aerul devin verzi (bilirubina trecînd în biliverdină), cum se întîmplă la copii, încă în intestin. Cînd stercobilinogenul se transformă în leucostercobilină, scaunele sînt albicioase. În caz de putrefacţie intestinală, scaunul este brun. În fermentaţie accentuată, galben. În acholie, scaunul este albicios-argilos (ca extrementele de cîine). La fel în steatoreea din pancreatita cronică şi în cazul unei cantităţi mari de grăsimi nedigerate. În tuberculoza intestinală şi în cea peritoneală se constată, scaune decolorate, galben deschise după un regim lactat hidric, în timp ce ele sînt brune după un regim carnat. După consumarea de legume verzi şi după administrarea de calomel, scaunele sînt verzi, după sena, rhubarba şi xantonină sînt galben-brune, după fier, bismut şi cărbune sînt brun-negre. În hemoragii ale tubului digestiv şi după ingerarea de alimente cu sînge, scaunul este negru ca păcura.

Mirosul scaunului este datorat indolului şi scatolului. Cele de consistenţă dură, cele din holeră şi diareele nervoase sînt aproape inodore. Cele grăsoase au un miros foarte pătrunzător, datorat acizilor graşi. Mirosul putrid denotă o putrefacţie exagerată, iar unul foarte acid o fermentaţie.

Scaunul este fetid în colitele ulceroase, cancerul de colon şi rectal. În dezinterie, scaunele au miros de spermă. Uneori scaunele sînt eterogene; aşa sînt în diareea falsă, achilia gastrică şi pancreatita cronică (creatoree, conţin ţesut muscular nedigerat în forma unor aşchii); colitele ulceroase şi ulceromembranoase, cancerul intestinal şi rectal, febra tifoidă (se aşază în două straturi, unul inferior grunzos şi altul superior lichid; sau are aspect de pireu de linte sau zeamă de pepeni),

Scanned with OKEN Scanner

holeră (ca zeama de orez, la fel și în intoxicația cu arsen și în lambliază). În stenoza rectală, scaunul are forma de creion.

În mod patologic, scaunele pot conține sînge, mucus și puroi.

Sîngele este *roșu*, cînd provine din partea de jos a tubului digestiv (cu excepția cazurilor cînd stagnează mult și devine negru) — hemoroizi, polipi, dizenterie, cancer — și *negru* (melenă), prin transformarea hemoglobinei în hematină, cînd vine de sus — hemoragii nazale și faringiene, ulcer gastric și duodenal, cancer gastric, febră tifoidă, tuberculoză intestinală, enterite și colite, ocluzie intestinală, embolia și tromboza vaselor mezenterice, diateze hemoragice (afară de cazul cînd tranzitul este foarte accelerat și scaunul își păstrează culoarea roșie). Pentru depistarea hemoragiilor oculte se folosesc reacții speciale.

Mucusul se găsește în stazele (constipații) și ocluziile intestinale și în iritații produse de factori chimici, bacterieni și nervoși, sub formă de filamente și, flocoane, sau sub formă de pseudomembrane și lambouri. Cel provenit din ileon se găsește în scaun în cazul unui tranzit accelerat, în formă de flocoane galben-verzui (datorită bilirubinei sau biliverdinei), amestecate cu fecalele. În iritațiile cecului, mucusul se află în scaune sub formă de grămezi mucoide vîscoase-brune, ce conțin numeroși microbi. În caz că provine din colon, mai ales din porțiunea distală, mucusul este net separat de fecale, sau se elimină după ele. În supurațiile perirectale, ca cele din Douglas, mucusul conținut se elimină sub aspect de albuș de ou.

Puroiul este datorat proceselor care se petrec la nivelul segmentului inferior al colonului (dizenterii, rectite, cancer rectal) sau cînd scaunul este constituit numai din puroi poate proveni din deschiderea unui abces de vecinătate în porțiunea terminală a intestinului.

1. | REACȚIA

Se ia o hîrtie de turnesol roșie și alta albastră și se umezesc ușor cu apă distilată. Apoi se aplică pe materiile fecale. Este foarte important ca materiile fecale să nu fi fost colectate în același vas în care a urinat bolnavul. În cazul scaunelor eterogene se determină reacția mai multor părți ale lor.

Dacă reacția este acidă, hîrtia de turnesol albastră virează în roșu, iar cea roșie își păstrează culoarea. Dacă reacția este neutră, hîrtia albastră rămîne albastră, iar cea roșie rămîne tot roșie. În mod *normal*, reacția este *ușor alcalină*. În putrefacțiile exagerate se constată reacții puternic alcaline, iar în fermentațiile foarte accentuate, reacția este acidă.

Scanned with OKEN Scanner

2. | DEPISTAREA HEMORAGIILOR OCULTE

Se face cu ajutorul unor reacţii microchimice bazate pe acţiunea peroxidazică a hemoglobinei (vezi identificarea sîngelui în urină). Pentru a nu obţine reacţii false, cel puţin 3—4 zile înainte de executarea probelor, pacientul trebuie să nu consume carne, peşte, bulion de carne, sau orice alt fel de extract de carne sau să nu i se fi administrat preparate cu fier. Se va avea în atenţie, în special în cazurile cu constipaţie habituală sau accidentală, cînd vom semnala începerea regimului de probă prin administrarea de cărbune pe care îl vom urmări, microscopic, în materiile fecale. Trebuie să mai excludem existenţa hemoragiilor datorate unor hemoroizi sau rectite, iar la femei poate ajunge în scaun sîngele menstrual. Se bănuieşte existenţa unei hemoragii inferioare ori de cîte ori, făcînd reacţiile, se constată prezenţa sîngelui numai într-o porţiune a scaunului. De aceea, ca o conduită generală, se fac reacţiile din diferite porţiuni ale scaunului şi se repetă mai multe zile în şir.

2.1. | Reacţia Gregersen

Principiul: pag. 418. pct. 3.8.

Reactivul Gregersen: la 5 *ml* acid acetic 50% se adaugă 0,025 *g* benzidină şi 0,1 g peroxid de bariu şi se agită pînă la completa dizolvare.

Tehnica. Se întinde pe o lamă de microscop un frotiu din materiile fecale (o particulă cît un bob de grîu). Aşezăm lama pe un suport deasupra unei hîrtii albe. Se pun apoi pe lamă cîteva picături de reactiv Gregersen. În cazul cînd sîngele este prezent în materiile fecale, lama se colorează în albastru. Cînd coloraţia albastră este intensă şi apare în cîteva secunde, reacţia este intens pozitivă: cantitatea de sînge este de aproximativ 5%. Cînd coloraţia apare după 30 *s*, corespunde unui conţinut de sînge de 1—5%.

Sîngerările oculte se produc, în afară de ulcerul gastrointestinal şi în cancerul gastric sau intestinal, în bolile hemoragipare, în ciroza hepatică şi la icterici, şi în parazitoze intestinale (mai ales anchilostomiaza duodenală şi trichocefaloză).

2.2. | Reacţia Adler

Principiu: vezi pag. 418.

Se diluează o porţiune din materiile fecale 1/10 cu apă. Se iau 5 *ml* din această diluţie într-o eprubetă şi se adaugă, succesiv şi agi-

Scanned with OKEN Scanner

tînd, 1—2 *ml* din soluţia alcoolică de benzidină (1 *g*/10 *ml* alcool 95°, se concentrează prin încălzire foarte uşoară şi se filtrează după răcire; se prepară extemporaneu), 4—5 picături de acid acetic glacial şi se amestecă. Apoi se pun 2 picături de apă oxigenată 3%. În mod normal nu se produce nici o coloraţie. Cînd sîngele este prezent în scaun, se produce o coloraţie albastră-verzuie.

3. | DETERMINAREA CALCIULUI ÎN FECALE

Proba se practică atunci cînd se urmăreşte stabilirea bilanţului calciului. Se calcinează la 400°C o cantitate cîntărită de fecale. După răcire, reziduul se dizolvă în 10 *ml* HCl *n*/10. Soluţia se pune într-un balon cotat şi se diluează într-un volum cunoscut de apă distilată. Se ia o probă pe care se face dozarea prin permanganometrie sau complexometrie.

Interpretare. La stabilirea bilanţului calciului trebuie cunoscută cantitatea de calciu din alimente şi se determină calciuria şi eliminarea fecală.

În mod normal, bilanţul este echilibrat (calciul excretat = calciul ingerat) la adult, iar eliminarea prin fecale este de 500—700 *mg*/24 *h*.

La copii, adolescenţi şi gravide, bilanţul este pozitiv. În alăptare este negativ. Bilanţul este negativ în boala Recklinghausen, osteoporoze, osteomalacie etc.

BIBLIOGRAFIE

1) Manta, I., Ciplea, Al., *Metodele laboratorului clinic*, Cartea Românească, Cluj, 1947. 2) Bailanger, J., Clyti, B., Le Hir, A., Arch. Mal. App. digestif, 1956, *45*, *45*. Haţieganu I., Goia I., — Tratat elementar de semiologie şi patologie medicală. Volumul II. Ed. Cartea Românească, Cluj 1936.

4. | DETERMINAREA LIPIDELOR ÎN MATERIILE FECALE

Principiu. Se extrag lipidele totale dintr-o emulsie de materii fecale acidifiate şi se determină gravimetric. Extracţia unei alte porţiuni din emulsie la un *pH* alcalin permite dozarea lipidelor nescindate iar extracţia în mediu acid a rezidiului permite dozarea acizilor graşi liberi. Rezultatele se exprimă în procente din lipidele ingerate pe 24 de ore.

Scanned with OKEN Scanner

Reactivi: 1) HCl concentrat; 2) NaOH 10%; 3) alcool etilic 96%; 4) Eter de petrol.

Tehnica. Subiectul este supus unui regim alimentare standard conţinînd 75—105 g proteine, 100—135 g lipide şi 180 g hidraţi de carbon, timp de 5—6 zile consecutiv. Fecalele eliminate în primele două zile se aruncă, iar fecalele emise pe următoarele 3—4 zile se adună într-un vas cîntărit în prealabil şi se păstrează la +4°C pentru a reduce cît mai mult hidroliza lipidelor.

Se cîntăreşte din nou vasul şi se obţine greutatea materiilor fecale, scăzîndu-se greutatea vasului gol. Materiile fecale se omogenizează apoi cît mai bine.

Pentru dozarea lipidelor totale se iau apoi 10 g materii fecale şi se efectuează o emulsie omogenă cu 20 *ml* apă distilată. Se pipetează 3 *ml* din această emulsie şi se trec într-o eprubetă de centrifugă de 50 *ml* cu dop rodat. Se adaugă 2 picături HCl concentrat şi se amestecă (*pH* va fi sub 3). Se adaugă 5 *ml* etanol şi 20 *ml* eter de petrol, se astupă şi se agită bine timp de 10 minute. Se centrifughează 5 minute la 2500 r.p.m. Se transferă stratul de eter de petrol într-un flacon Erlenmeyer de 125 *ml* cîntărit în prealabil. Se repetă extracţia reziduului încă de două ori iar extractele în eter de petrol se trec în flaconul Erlenmeyer. Se evaporează solventul şi se cîntăreşte, scăzîndu-se din această valoare greutatea flaconului Erlenmeyer. Greutatea obţinută reprezintă cantitatea de lipide totale conţinută de 1 g materii fecale.

Pentru dozarea lipidelor nehidrolizate se iau alţi 3 *ml* de emulsie de materii fecale, se aduce valoarea *pH* la 8 cu hidroxid de sodiu 10% şi se efectuează apoi extracţia lipidelor aşa cum s-a arătat mai sus.

Greutatea reziduului rămas după evaporarea solventului organic reprezintă cantitatea de lipide nehidrolizate aflată în 1 *g* materii fecale.

Din reziduul rămas în tubul de centrifugă, după extracţia lipidelor nehidrolizate, se dozează apoi *acizii graşi liberi.* În acest scop se acidulează cu acid clorhidric concentrat pînă la *pH3* sau sub această valoare şi se procedează la extracţie aşa cum s-a arătat pentru lipidele totale. Greutatea reziduului rămas după evaporarea eterului de petrol indică acizii graşi liberi aflaţi în 1 g materii fecale.

Valori normale şi interpretare. Chiar şi pe lîngă o dietă lipsită de grăsimi se pot detecta în fecale 2—3 g lipide (din celule descuamate, bacterii, secreţii). În mod obişnuit lipidele nu depăşesc 25% din greutatea uscată a materiilor fecale. Procentul de lipide din greutatea umedă sau uscată a materiilor fecale depinde însă în mare măsură de resturile vegetale nedigestibile din alimente care cresc greutatea fecalelor emise. Din acest motiv singura exprimare corectă este sub formă

Scanned with OKEN Scanner

de procent din lipidele ingerate (cantitatea de lipide ingerate se poate calcula pe baza unor tabele care indică conținutul în lipide al alimentelor consumate). La normali lipidele din materiile fecale sînt de cel mult 7% din lipidele ingerate (aproximativ 7—14 g pe 24 ore pe lîngă regimul alimentar standard (vezi pag. 479). Acizii grași liberi (inclusiv săpunurile) reprezintă peste 40% din lipidele eliminate prin scaun (aproximativ 2,5—17 *mEq*/24 ore).

Creșterea lipidelor în scaun la valori procentuale ce depășesc 10% din lipidele ingerate indică o tulburare în digestia și absorbția lipidelor.

O astfel de situație se întîlnește în insuficiența pancreatică, lipsa bilei, în afecțiunile mucoasei intestinale și în obstrucția căilor limfatice. O eliminare masivă de lipide în scaun se constată în abetalipoproteinemie (vezi și pag. 202).

Observații. Prezența de ulei mineral în materiile fecale (ulei de parafină) produce o falsă creștere a eliminării lipidelor. Dacă fecalele sînt de consistență lichidă se vor lua 10 *ml* pentru omogenizare și emulsificare fără a se mai dilua. Extracția se face din 1 *ml* materii fecale lichide emulsificate.

Digestia și absorbția lipidelor poate fi urmărită cu ajutorul trioleinei marcate cu Iod^{131}, rezultatele expunîndu-se sub formă de procentaj al radioactivității emise în fecalele recoltate timp de trei zile consecutive după administrarea orală a 50—100 μCi trioleină marcată. (De exemplu s-au administrat 70 μCi trioleină marcată iar eliminarea în decurs de trei zile a fost de 35 μCi. Deci 50% din trioleina marcată s-a eliminat prin fecale). La normali, radioactivitatea din fecalele recoltate pe timp de 72 ore nu depășește 6% din doza radioactivă administrată.

BIBLIOGRAFIE

Jover, A., Gordon, R. S. jr., J. Lab. Clin. Med., 59, 1962, 878.; Lynch, M. I., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., Inwood, M. I. H., *Medical Laboratoruy Technology and Clinical Pathology*, Ed. W. B. Saunders, Philadelphia—London—Toronto, 1969.

5. | DOZAREA ENZIMELOR ÎN MATERIILE FECALE

Principalele enzime din materiile fecale sînt de origine pancreatică. Dozarea acestor enzime furnizează însă relații puțin fidele asupra funcției pancreasului întrucît activitatea enzimatică a materiilor fecale nu depinde numai de cantitatea de enzime secretate dar și de gradul

Scanned with OKEN Scanner

de inactivare al acestora, respectiv de viteza tranzitului intestinal. Rezultatele mai reproductibile s-au obținut în cazul tripsinei și chimotripsinei. Redăm mai jos o metodă semicantitativă de dozare a fermenților proteolitici în materiile fecale.

5.1. | Determinarea enzimelor proteolitice în materiile fecale

Principiu. Diluții progresive din materiile fecale sînt incubate cu cantități standard de gelatină. Cea mai mare diluție a materiilor fecale capabilă să mai producă o digestie completă a gelatinei constituie măsura activității proteolitice.

Reactivi. 1) Soluție carbonat de sodiu 5%. Se dizolvă 5 *g* Na_2CO_3 anhidru și se aduce volumul la 100 *ml* cu apă distilată. *2*) Soluție gelatină 7,5%. Se dizolvă 7,5 g gelatină pură în 80 *ml* apă distilată fierbinte. Se lasă pe o baie de apă la 37°C, iar după ce soluția a atins această temperatură se aduce volumul la 100 *ml* cu apă distilată încălzită în prealabil la 37°C. Soluția se păstrează la +4°C dar se reîncălzește la 37°C înainte de utilizare.

Tehnica. Se efectuează o diluție 1/10 a materiilor fecale cu soluție carbonat de sodiu 5%. Se trec 2 *ml* din această diluție într-o eprubetă. Într-un șir de alte 8 eprubete se pipetează cîte 2 *ml* soluție carbonat de sodiu. În prima din aceste 8 eprubete se trec 2 *ml* din diluția inițială de materii fecale, se amestecă și se trec 2 *ml* din amestec în eprubeta următoare. Se continuă diluarea progresivă iar din ultima eprubetă se scot 2 *ml* și se aruncă. Se obține astfel un șir de 9 eprubete cu diluții ale materiilor fecale de la 1/10 la 1/2560, în volum de 2 *ml.* Ca martor se folosește o a 10-a eprubetă conținînd 2 *ml* carbonat de sodiu. În toate cele 10 eprubete se adaugă 2 *ml* soluție de gelatină încălzită la 37°C și se incubează la această temperatură timp de 60 minute. După acest interval de timp se plasează stativul cu eprubetele la +4°C timp de cel puțin două ore (eventual pînă a doua zi). După refrigerare gelatina nehidrolizată se va gelifica iar activitatea enzimatică este dată de ultima diluție de materii fecale care a mai produs lichefierea gelatinei (lipsa gelificării la +4°C).

Interpretare. În mod normal, gelatina este lichefiată de o diluție de cel puțin 1/80. Valori sub 1/40 sugerează o insuficiență pancreatică.

Observații. O metodă mai simplă constă în urmărirea digestiei gelatinei de pe filmele Rx nedevelopate. În acest scop se plasează pe suprafața unei bucăți de film radiologic cîte o picătură din fiecare diluție (diluțiile se efectuează în carbonat de sodiu 1%). Fragmentele de film se incubează într-o placă Petri la 37°C timp de 30 minute,

Scanned with OKEN Scanner

se răcește apoi la +4°C timp de 30 minute și se lasă un curent de apă să treacă pe suprafața filmului. Zonele digerate ale gelatinei de pe filmul de Rx indică activitatea proteolitică.

Ambele aceste procedeuri pot fi adaptate și pentru sucul duodenal. De notat însă că aceste metode pot fi utilizate doar pentru orientare clinică. Metode cantitative mai precise folosesc ca substrat hemoglobina sau caseina și determină produșii de proteoliză rezultați. O metodă de mare precizie se bazează pe hidroliza benzoil-argininetil-esterului un substrat sintetic al tripsinei. Pentru aceste metode se dă doar indicația bibliografică:

Rick, W., *Chymotrypsin- und Trypsin* in Bergmeyer, H. U., *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, p. 800—818.

BIBLIOGRAFIE

Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., Inwood, I. H., *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology*, Ed. W. Saunders, Philadelphia—London—Toronto, 1969.

6. ANALIZA ALTOR COMPONENTE DIN FECALE (ACIZI ORGANICI, AMINOACIZI ȘI AMONIAC, PIGMENȚI BILIARI, MUCUS ȘI PROTEINE EXUDATIVE).

Reactivi. 1) Clorură ferică 1%. *2*) Cărbune vegetal. *3*) Albastru de bromfenol 1% în alcool 95°. *4*) Soluție fenolftaleină 2% în alcool 95°. *5*) Soluție HCl 2% și soluție 0,2 *n*. *6*) Formol diluat 1/2 și neutralizat în prezență de fenolftaleină. *7*) Soluție NaOH 0,1 *n* și 5 *n*. *8*) Soluție acid tricloracetic 40%. *10*) Reactivul fosfotungstic Folin-Denis: 100 *ml* soluție wolframat de Na 10%, 80 *ml* acid fosforic 85% și 750 *ml* apă distilată. Se fierbe cu reflux timp de 2 ore. După răcirea completă se aduce la 1 litru cu apă distilată. *11*) Soluție stoc de tirozină: se dizolvă 100 *mg* tirozină, uscată pe anhidridă fosforică, în 10 *ml* H_2SO_4 0,5 *n*. Soluția fiică se face în felul următor: se neutralizează 5 *ml* soluție stoc cu 5 *ml* NaOH 0,5 *n* și se completează la 50 *ml* cu apă distilată. Concentrația soluției diluate este 0,01%. *12*) Reactiv Folin-Ciocâlteu (vezi dozarea proteinelor serice prin metoda Lowry).

Tehnica. 1) *Prepararea unei diluții de fecale 10%*. Se triturează într-un mojar sau într-un pahar cu ajutorul unui agitator (în funcție de consistența fecalelor) 15 g fecale cu 150 *ml* apă distilată, care se

Scanned with OKEN Scanner

adaugă cu atît mai încet cu cît fecalele sînt mai consistente. Amestecul final trebuie să fie perfect omogen.

Se pun deoparte 10—15 *ml*. Restul se tratează succesiv cu 1 *ml* $FeCl_3$ 1%, apoi cu 2 *g* pulbere de carbonat de calciu.

Se filtrează după 5 *min*. Pe filtrat se dozează acizii organici şi amoniacul împreună cu aminoacizii. Se decolorează cu cărbune vegetal. Pe lichidul de diluţie se determină *pH*-ul, se cercetează şi se identifică pigmenţii biliari, se dozează mucusul solubil şi albuminele exudative.

2) *Dozarea acizilor organici.* Se măsoară într-un pahar de 20 *ml* filtrat incolor, 30 *ml* apă distilată şi se neutralizează cu HCl 2% în prezenţă de fenolftaleină, pînă la coloraţie slab roz. Se adaugă 2 picături albastru de bromfenol şi se titrează cu HCl 0,2 *n* pînă la viraj la galben.

Calcul. Fie *n* numărul de *ml* HCl 0,2 *n* utilizaţi la titrare. Aceştia corespund la 20 *ml* din diluţia de fecale 10%, deci la 2 *g* fecale. Prin urmare:

$\frac{n \times 50}{5} = n \times 10$ acizi organici la 100 *g* fecale (exprimaţi în HCl *n*).

3) *Dozarea amoniacului şi a aminoacizilor.* Într-un pahar se introduc: 20 *ml* filtrat incolor, 20 *ml* apă distilată şi se neutralizează în prezenţă de fenolftaleină, cu HCl 2%, pînă la coloraţie foarte slab roză. Se adaugă 10 *ml* formol 1/2, neutralizat. Se dozează aciditatea cu NaOH 0,1 *n* pînă la culoare roz.

Calcul n ml NaOH 0,1 *n* corespund la 20 *ml* din diluţia 10%:

$\frac{n \times 50}{10} = n \times 5$ amoniac şi aminoacizi la 100 *g* fecale (exprimaţi în *ml* NaOH *n*).

4) *Determinarea pH-ului* se face pe lichidul de diluţie cu hîrtie indicator de *pH*, sau cu *pH*-metru.

5) *Cercetarea pigmenţilor biliari.* Într-o eprubetă se introduc 5 *ml* diluţie de fecale, 5 *ml* HCl conc. şi 1 picătură $FeCl_3$ 5%. Se încălzeşte uşor. Prezenţa stercobilinei se traduce printr-o culoare a cărei intensitate variază de la brun-roşiatic la roşu carmin, după abundenţa pigmentului. Bilirubina dă o coloraţie verde, care se adsoarbe pe depozit.

6) *Cercetarea mucusului solubil şi a proteinelor exudative.*

Principiu. Diluţia de fecale se tratează întîi cu acid acetic diluat pentru cercetarea mucusului solubil. Prin centrifugare se obţine un lichid limpede pe care se decelează prezenţa proteinelor exudative

Scanned with OKEN Scanner

nedegradate prin acid tricloracetic. Se izolează prin centrifugare şi se dozează conţinutul în tirozină cu reactivul Folin-Ciocâlteu.

Lichidul limpede, decantat, se tratează cu reactivul Folin-Denis, care precipită proteinele exudative degradate, solubile în acid tricloracetic, dar insolubile în acid fosfotungstic. Se izolează prin centrifugare şi se dozează cu reactivul Folin-Ciocâlteu.

a) *Mucusul solubil.* Într-un tub de centrifugă se amestecă 2,5 *ml* diluţie de fecale 10% cu 7,5 *ml* acid acetic 5%. Se lasă în repaus 15—20 *min*, apoi se citeşte reacţia. În mod normal flocularea se produce în aşa fel, încît lichidul rămîne tulbure între particulele coagulate. În prezenţa mucusului, flocularea este completă şi lichidul se clarifică.

b) *Dozarea proteinelor exudative nedegradate*, precipitabile prin acid tricloracetic. La 1 oră după citirea reacţiei precedente, se centrifughează eprubeta timp de 10 *min.* la 4000 r.p.m. Se decantează supernatantul clar şi se adaugă acestuia 2 *ml* acid tricloracetic 40%. Se aşteaptă o oră. În mod normal apare un nor uşor. Dacă apare un precipitat, se centrifughează. Se spală precipitatul şi se aduce în suspensie cu cîţiva *ml* de apă distilată, apoi se centrifughează din nou. Determinarea tirozinei se face după metoda descrisă mai jos. Cifra găsită corespunde proteinelor exudative nedegradate, precipitabile prin acid tricloracetic. Ele sînt semnul unei leziuni parietale colice, serioase.

c) *Dozarea proteinelor exudative degradate*, solubile în acid tricloracetic, dar insolubile în acid fosfowolframic. Se adaugă la lichidul provenit din tratarea precedentă cu acid tricloracetic, 2 *ml* reactiv Folin-Denis. Cînd floculatul începe să sedimenteze, se centrifughează, se spală precipitatul cu cîţiva *ml* de apă distilată, apoi se repetă centrifugarea.

Pentru determinarea indicelui tirozinic, se dizolvă sedimentul în 2 *ml* NaOH 0,1 *n*, apoi se adaugă: 0,5 *ml* NaOH 20%, 0,5 *ml* reactiv Folin-Ciocâlteu, apă distilată ad 10 *ml*. Se citeşte după 15 *min.* la 700 *nm* şi se raportează la curba de etalonare preparată în felul următor:

Soluţie fiică tirozină 0,01 % (*ml*)	0,25	0,5	1	2	3	4	5
Apă distilată (*ml*)	6,75	6,5	6	5	4	3	2
NaOH 0,1 *n* (*ml*)	2	2	2	2	2	2	2
(*mg* tirozină/100 *g* fecale)	10	20	40	80	120	160	200)

Interpretare. Valori normale. *Acizi organici:* 14—16 *ml* HCl *n*; creşterea lor este un indice al exagerării fenomenelor de fermentaţie (colite de fermentaţie); *amoniac şi aminoacizi:* 3 *ml* NaOH *n*; creşterea lor este un indice al exagerării fenomenelor de putrefacţie; *stercobilina*, reacţie pozitivă (reacţia negativă indică lipsa de trecere a bilei

Scanned with OKEN Scanner

în intestin); *bilirubina*, reacţie negativă (reacţia pozitivă indică o accelerare a tranzitului intestinal, evacuarea prea rapidă a ceculuí); *mucusul solubil*, lipsă de clarefiere; *proteine exudative nedegradate*, urme, *proteine exudative degradate*, sub 60 *mg* tirozină/100 *g* fecale. Prezenţa mucusului solubil şi a proteinelor exudative în cantitate anormală indică ulceraţii ale mucoasei intestinale.

BIBLIOGRAFIE

Bailenger, J., Clyti et Le Hir, A., Arch. Mal. Ap. digestif. 45, 1956, p. 45.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA I

UNITĂȚI DE MĂSURĂ

Instrucțiunile Oficiului de Stat pentru metrologie (1968). Icsulescu și alții. Sistemul internațional a măsurii. Ed. tehnică, 1970.

UNITĂȚI SI DE BAZĂ

Cantitatea fizică	*Numele Unității*	*Simbolul unității*
lungimea	metru	m
masă	kilogram	kg
timp	secundă	s
curent electric	amper	A
temperatură termodinamică	grad Kelvin	K sau °K
intensitate luminoasă	candelă	cd

UNITĂȚI SUPLIMENTARE*

unghi plan	radian	rad
unghi solid	steradian	sr

FRACȚII ȘI MULTIPLI**

Fracția	*Prefixul*	*Simbolul*	*Multiplul*	*Prefixul*	*Simbolul*
10^{-1}	deci	d***	10	deca	da***
10^{-2}	centi	c***	10^{2}	hecto	h
10^{-3}	mili	m	10^{3}	kilo	k
10^{-6}	micro	μ	10^{6}	mega	M
10^{-9}	nano	n	10^{9}	giga	G
10^{-12}	pico	p	10^{12}	tera	T
10^{-15}	femto	f			
10^{-18}	ato	a			

* Aceste unități sînt adimensionale.

** Nu se vor utiliza prefixe compuse. Astfel 10^{-9} metri este reprezentat de 1 *nm* nu de 1 *mμm*. Atașarea unui, prefix la o unitate constituie de fapt o nouă unitate, astfel că 1 $km^3 = 1\ (km)^3 = 10^9\ m^3$, și nu 1 $k(m^2) = 10^3 m^2$.

*** Se vor folosi cît mai rar posibil.

Scanned with OKEN Scanner

UNITĂȚI SI DERIVATE

Cantitatea fizică	*Numele unității*	*Simbolul unității*	*Definiția unității*
energie	joule	J	$kg \cdot m^2 \cdot s^{-2} = N \cdot m$
forță	newton	N	$kg \cdot m \cdot s^{-2} = J \cdot m^{-1}$
putere	Watt	W	$kg \cdot m^2 \cdot s^{-3} = J \cdot s^{-1}$
sarcină electrică	coulomb	C	$A \cdot s$.
diferență de potențial electric	volt	V	$kg \cdot m^2 \cdot s^{-3} \cdot A^{-1} = J \cdot A^{-1} \cdot s^{-1}$
rezistență electrică	ohm	Ω	$kg \cdot m^2 \cdot s^{-3} \cdot A^{-2} = V \cdot A^{-1}$
capacitate electrică	farad	F	$A^2 \cdot s^4 \cdot kg^{-1} \cdot m^2 = A \cdot s \cdot V^{-1}$
flux magnetic	weber	Wb	$kg \cdot m^2 \cdot s^{-2} \cdot A^{-1} = V \cdot s$
inductanță	henry	H	$kg \cdot m^2 \cdot s^{-2} \cdot A^{-2} = V \cdot s \cdot A^{-1}$
densitate de flux magnetic	tesla	T	$kg \cdot s^{-2} \cdot A^{-1} = V \cdot s \cdot m^{-2}$
flux luminos	lumen	lm	$cd \cdot sr$.
iluminare	lux	lx	$cd \cdot sr \cdot m^{-2}$
frecvență	hertz	Hz	cicli pe secundă
temperatură obișnuită, t	grad Celsius	°C	$t°C = T°K - 273{,}15°$

ALTE UNITĂȚI DERIVATE

Cantitatea fizică	*Unitate SI*	*Simbolul unității*
suprafață	metru pătrat	m^2
volum	metru cub	m^3
densitate	kilogram pe metru cub	$kg \cdot m^{-3}$
viteză	metru pe secundă	$m \cdot s^{-1}$
viteză unghiulară	radian pe secundă	$rad \cdot s^{-1}$
accelerație	metru pe secundă pătrată	$m \cdot s^{-2}$
presiunea	newton pe metru pătrat	$N \cdot m^{-2}$
vîscozitatea cinematică, coeficient de difuzie	metru pătrat pe secundă	$m^2 \cdot s^{-1}$
vîscozitate dinamică	newton-secundă pe metru pătrat	$N \cdot s \cdot m^2$
intensitatea cîmpului electric	volt pe metru	$V \cdot m^{-1}$
intensitatea cîmpului magnetic	amper pe metru	$A \cdot m^{-1}$
luminanță	candelă pe metru pătrat	$cd \cdot m^{-2}$

Scanned with OKEN Scanner

UNITĂȚI ADMISE, LEGATE DE SI

Cantitatea fizică	*Numele unității*	*Simbolul unității*	*Definiția unității*
lungime	parsec	pc	$30{,}87 \cdot 10^{15}$ m
suprafață	barn	b	10^{-28} m^2
	hectar	ha	10^4m^2
volum	litru	l	10^{-3}m^3 = dm^3
presiune	bar	bar	10^5N · m^{-2}
masă	tonă(tonă metrică)	t	10^3kg = Mg
densitatea de flux magnetic (inducție magnetică)	grauss	G	10^{-4}T
radioactivitate	curie	Ci	$37 \cdot 10^9$ s^{-1}
energie	electron-volt	eV	$1{,}6021 \cdot 10^{-19}$ J

Unitățile obișnuite de timp, ca ora sau anul, vor persista și, de asemenea, într-un context adecvat, gradul unghiular.

EXEMPLE DE UNITĂȚI CONTRARII SI, CU ECHIVALENȚII LOR

Cantitatea fizică	*Numele unității*	*Echivalenți*
lungime	Ångström	10^{-10} m
	inci(inch)	0,0254 m
	picior(foot)	0,3048 m
	milă	1,60934 km
suprafață	inci pătrat	645,16 mm^2
	picior pătrat	0,092903 m^2
	acru	4046,9 m^2
volum	inci cubic	$1{,}63871 \cdot 10^{-5}$ m^3
	picior cubic	0,028317 m^3
masă	livră, funt(pound)	0,4535924 kg
	uncie (ounce)	28,3495 g
	grain	64,799 mg
densitate	livră/inci cubic	$2{,}76799 \cdot 10^4$ kg · m^{-3}
forță	dină	10^{-5} N
	poundal	0,138255 N
presiune	atmosferă	101,325 kN · m^{-2}
	torr	133,322 N · m^{-2}
energie	erg	10^{-7}J
	calorie (termochimică)	4,184 J
	unitate termică britanică (btu)	1055,06 J
	kilowatt-oră, kW · h	3,6 MJ
putere	cal putere	745,700 W

Scanned with OKEN Scanner

TABEL DE CONVERSIUNE din *mg%* în *mEq*/litrn

Sodiu		*Potasiu*		*Clor*		*Rezervă alcalină*		*Protide*	
mg%	*mEq/1*	*mg%*	*mEq/1*	*mg%*	*mEq/1*	*vol%*	*mEq/1*	*g%*	*mEq/1*
				290	81				
250	109			95	82				
55	111			300	84				
60	113			05	85				
65	115			10	87				
70	117	7	1,75	15	88				
75	120	8	2	20	89.				
80	122	9	2,2	25	91	10	4,5	2,5	6,4
85	124	10	2,5	30	93	15	7	3,0	7,3
90	126	11	2,7	35	94	20	9	3,5	8,5
95	128	12	3	40	96	25	11	4,0	9,7
300	130	13	3,2	45	97	30	13,5	5,4	10,9
05	133	14	3,5	50	98	35	15	5,0	12,1
10	135	15	3,7	55	100	40	18	5,5	13,3
15	137	16	4	60	102	45	20		
20	139	17	4,3	65	103	50	22,5	6,0	14,6
25	141	18	4,6	70	104	55	25	6,5	15,8
30	143	19	4,9	75	106	60	27	7,0	17
35	146	20	5,1	80	107	65	29	7,5	18,2
40	148	21	5,3	85	108	70	31,5	8,0	19,4
45	150	22	5,6	90	109	75	34	8,5	20,6
50	152	23	5,8	95	111	80	36	9,0	21,9
55	154	24	6,1	400	112	85	38	9,5	23,1
60	156	25	6,4	05	113	90	40,5	10,0	24,3
65	159	26	6,7	10	115	95	43		
70	161	27	6,9	15	116	100	45		
75	163	28	7,2	20	117	105	47		
80	165	29	7,4	25	119	110	50		
85	167	30	7,7	30	120				
90	169	31	7,9	35	122				
95	172	32	8,2	40	123				
400	174	33	8,4	45	125				
05	176	34	8,7	50	126				
10	178	35	8,9	55	127				
		36	9,2	60	129				
		37	9,4	65	131				

Scanned with OKEN Scanner

TRANSFORMAREA TRANSMISIEI ÎN EXTINCȚIE

(după formnla $E = 2 - \log T$)

Transmisie %	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8
0	—	2.699	2.398	2.222	2.097
1	2.000	1.921	1.854	1.796	1.745
2	1.699	1.658	1.620	1.585	1.553
3	1.523	1.495	1.469	1.444	1.420
4	1.398	1.377	1.357	1.337	1.319
5	1.301	1.284	1.268	1.252	1.237
6	1.222	1.208	1.194	1.180	1.168
7	1.155	1.143	1.131	1.119	1.108
8	1.097	1.086	1.076	1.066	1.055
9	1.046	1.036	1.027	1.018	1.009
10	1.0000	.9914	.9830	.9747	.9666
11	.9586	.9508	.9431	.9356	.9281
12	.9208	.9137	.9066	.8996	.8928
13	.8861	.8794	.8729	.8665	.8601
14	.8539	.8477	.8416	.8356	.8297
15	.8239	.8182	.8125	.8069	.8013
16	.7959	.7905	.7852	.7799	.7747
17	.7696	.7645	.7594	.7545	.7496
18	.7447	.7399	.7352	.7305	.7258
19	.7212	.7167	.7122	.7077	.7033
20	.6990	.6946	.6904	.6861	.6819
21	.6768	.6737	.6696	.6655	.6615
22	.6576	.6536	.6498	.6459	.6421
23	.6383	.6345	.6308	.6271	.6234
24	.6198	.6162	.6126	.6091	.6056
25	.6021	.5986	.5952	.5918	.5884
26	.5850	.5817	.5784	.5751	.5719
27	.5686	.5654	.5622	.5591	.5560
28	.5528	.5498	.5467	.5436	.5406
29	.5376	.5346	.5317	.5287	.5258
30	.5228	.5200	.5171	.5143	.5114
31	.5086	.5058	.5031	.5003	.4976
32	.4949	.4921	.4895	.4868	.4841
33	.4815	.4789	.4763	.4737	.4711
34	.4685	.4660	.4634	.4609	.4584
35	.4559	.4535	.4510	.4486	.4461
36	.4437	.4413	.4389	.4365	.4342
37	.4318	.4295	.4271	.4248	.4225
38	.4202	.4179	.4157	.4134	.4112
39	.4089	.4067	.4045	.4023	.4001
40	.3979	.3958	.3936	.3915	.3893
41	.3872	.3851	.3830	.3809	.3788
42	.3768	.3747	.3726	.3706	.3685
43	.3665	.3645	.3625	.3605	.3585

Scanned with OKEN Scanner

Transmisie %	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8
44	.3565	.3546	.3526	.3507	.3487
45	.3468	.3449	.3429	.3410	.3391
46	.3372	.3354	.3335	.3316	.3298
47	.3279	.3260	.3242	.3224	.3206
48	.3188	.3170	.3152	.3134	.3116
49	.3098	.3080	.3063	.3045	.3028
50	.3010	.2993	.2975	.2959	.2941
51	.2924	.2907	.2890	.2873	.2857
52	.2840	.2823	.2807	.2790	.2774
53	.2757	.2741	.2725	.2708	.2692
54	.2676	.2660	.2644	.2628	.2412
55	.2596	.2581	.2565	.2549	.2534
56	.2518	.2503	.2487	.2472	.2457
57	.2441	.2426	.2411	.2396	.2381
58	.2366	.2351	.2336	.2321	.2306
59	.2291	.2277	.2262	.2248	.2233
60	.2219	.2204	.2190	.2175	.2161
61	.2147	.2132	.2118	.2104	.2090
62	.2076	.2062	.2048	.2034	.2020
63	.2007	.1993	.1979	.1965	.1952
64	.1938	.1925	.1911	.1898	.1884
65	.1871	.1857	.1844	.1831	.1818
66	.1805	.1791	.1778	.1765	.1752
67	.1739	.1726	.1713	.1701	.1688
68	.1675	.1662	.1649	.1637	.1624
69	.1612	.1599	.1586	.1574	.1562
70	.1549	.1537	.1524	.1512	.1500
71	.1487	.14705	.1463	.1451	.1439
72	.1427	.1415	.1403	.1391	.1379
73	.1367	.1355	.1343	.1331	.1319
74	.1308	.1296	.1284	.1273	.1261
75	.1249	.1238	.1226	.1215	.1203
76	.1192	.1180	.1169	.1158	.1146
77	.1135	.1124	.1113	.1102	.1090
78	.1079	.1068	.1057	.1046	.1035
79	.1024	.1013	.1002	.0991	.0980
80	.0969	.0958	.0948	.0937	.0926
81	.0915	.0904	.0894	.0883	.0872
82	.0862	.0851	.0841	.0830	.0820
83	.0809	.0799	.0788	.0778	.0767
84	.0757	.0747	.0736	.0726	.0716
85	.0706	.0696	.0685	.0675	.0665
86	.0655	.0645	.0635	.0625	.0615
87	.0605	.0595	.0585	.0575	.0565
88	.0555	.0545	.0535	.0526	.0516
89	.0506	.0496	.0487	.0477	.0467
90	.0458	.0448	.0438	.0429	.0419
91	.0410	.0400	.0391	.0381	.0371
92	.0362	.0353	.0343	.0334	.0325

Scanned with OKEN Scanner

(*continuarea* **ANEXA II**)

Transmisie%	0.0	.0.2	0.4	0.6	0.8
93	.0315	.0306	.0296	.0287	.0278
94	.0269	.0260	.0250	.0241	.0232
95	.0223	.02140	.0204	.0195	.0186
96	.0177	.0168	.0159	.0150	.0141
97	.0132	.0123	.0114	.0106	.0097
98	.0088	.0079	.0070	.0061	.0052
99	.0044	.0035	.0026	.0017	.0009
100	.0000				

Scanned with OKEN Scanner

PROPRIETĂȚILE MASELOR PLASTICE UTILIZATE ÎN LABORATOR

Substanța	*Rezistența la cald* (°C)	*la rece* (°C)	*Proprietăți*	*Denumiri comerciale*
Polipropilenă	+150	−1	incasabilă, sterilizabilă	Hostalen, PPH, Moplen, Profax
Polietilenă de joasă presiune	+120	−20	incasabilă, poate fi sudată	Hostalen, Larlex, Vestolen
Polietilenă de înaltă presiune	+80	−30	incasabilă	Lupolen, Alathon, Polythene
Policlorură de vinil	+70	−25	incasabilă	Hostalit, Vinnol, Vestolit, Lutofan, Vinoflex, Vluidur Mipolan
Poliamide(nylon)	+80	−30	incasabilă, dură, sterilizabilă	Ultramid, Durethan, Zytel
Polimetacrilați (rășini acrilice)	+90	—	ușor de prelucrat, transparente	Plexiglas, Plexigum, Plexidur, Resartglas, Sadur, Perspex, Lucite
Politetrafluor-etilenă	+275	−200	incasabilă, neinflamabilă	Teflon, Fluon
Mase plastice pe bază de uree și melanin-formaldehidă	+150	—		Ultrapas, Keramin Plastopal
Polistirol	+70	—	flexibilă, dură,	Polystyrol, Vestyron, Trolitul

REZISTENȚA MASELOR PLASTICE LA AGENȚI CHIMICI

Substanța	*Acizi slabi*	*Acizi concentrați*	*Baze slabe*	*Baze concentrate*	*Alcooli*	*Esteri*	*Cetone*	*Benzine*	*Benzen*	*Ulei mineral*	*Uleiuri animale și vegetale*	*Hidrocarburi*	*Eter*
Polipropilenă	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−
Polietilenă de joasă presiune	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−
Polietilenă de înaltă presiune	+	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−	−
Policlorură de vinil	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	−
Poliamide (nylon)	−	−	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	−
Polimetacrilați	+	−	+	−	−	−	−	+	−	+	+	−	+
Politetrafluoretenă	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mase plastice pe bază de uree și melaninformaldehidă	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Polistirol	−	−	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−

+ : rezistent − : instabil

Scanned with OKEN Scanner

PREPARAREA SOLUȚIILOR CU CONCENTRAȚIE CUNOSCUTĂ

Pentru prepararea soluțiilor cu concentrație cunoscută, plecînd de la acizii concentrați și unele baze sub formă de soluție, este necesar să cunoaștem densitatea (d) și concentrația (%). În cele ce urmează dăm d și concentrația % a unor acizi și baze mai uzuale.

	d	$g\%$
1. Acid clorhidric HCl conc	1,189	37,10
2. Acid azotic HNO_3 conc	1,386	62,44
3. Acid sulfuric H_2SO_4 conc	1,840	95,60
4. Acid fosforic H_3PO_4 conc	1,170	85,00
5. Acid acetic glacial CH_3COOH	1,049	70,00
6. Hidroxid de amoniu NH_4OH conc	0,905	27,00 (NH_3)

Pentru prepararea soluțiilor aproximativ normale vom cîntări (g) sau măsura (ml) din substanța respectivă la 1000 (ml) soluție, după cum urmează:

Acizi $\approx n(g/1000)$		$(1000/ml)$	
1. Acid clorhidric	36,46 g	82,65	HCl
2. Acid azotic	63,02 g	72,81	HNO_3
3. Acid acetic	60,03 g	81,70	CH_3COOH
4. Acid sulfuric	49,04 g	27,85	H_2SO_4
5. Acid fosforic	32,68 g	38,69	H_3PO_4
6. Acid oxalic	63,00 g	—	$(COOH)_2 \cdot 2H_2O$
7. Acid tartric	75,02 g	—	$C_4O_6H_6$

Hidroxizi $\approx n$ $(g/1000\ ml)$			
1. Hidroxid de sodiu	40,01 g	—	NaOH
2. Hidroxid de potasiu	56,11 g	—	KOH
3. Hidroxid de amoniu	35,05 g	144	NH_4OH
4. Hidroxid de bariu	157,80 g	—	$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$
5. Hidroxid de calciu	37.05 g	—	$Ca(OH)_2$

Săruri $\approx n$ $(g/1000\ ml)$		
1. Carbonat de amoniu	48,04 g	$(NH_4)_2CO_3$
2. Clorură de amoniu	53,50 g	NH_4Cl
3. Oxalat de amoniu	71,05 g	$(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$
4. Sulfat de amoniu	66,05 g	$(NH_4)_2SO_4$
5. Sulfocianură de amoniu	76,12 g	NH_4SCN
6. Molibdat de amoniu	206,10 g	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$
7. Fosfat de amoniu	44,00 g	$(NH_4)_2HPO_4$
8. Sulfură de amoniu	34,07 g	$(NH_4)_2S$
9. Arsenit de sodiu	65,00*	$NaAsO_2$
10. Borat de sodiu	190,70	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$
11. Bromură de sodiu	102,90	NaBr
12. Acetat de sodiu	136,10	$CH_3COONa \cdot 3H_2O$
13. Clorură de sodiu	58,45	NaCl

Scanned with OKEN Scanner

Săruri $\approx n(g/1000\ ml)$

14. Hipoclorit de sodiu	37,23*	$NaClO$
15. Carbonat de sodiu anh.	53,00	Na_2CO_3
16. Carbonat de sodiu	143,10	$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$
17. Bicarbonat de sodiu	42,00	$NaHCO_3$
18. Fosfat disodic	119,40	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$
19. Azotit de sodiu	34,50*	$NaNO_2$
20. Azotat de sodiu	85,01	$NaNO_3$
21. Tiosulfat de sodiu	248,20	$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$
22. Sulfit de sodiu	126,10	$Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$
23. Sulfat de sodiu anh.	71,05	Na_2SO_4
24. Sulfat de sodiu	161,10	$Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$
25. Nitroprusiatul de sodiu	148,92	$Na_2/Fe(CN)_5(NO)/2H_2O$
26. Alaun de aluminiu şi potasiu	118,60	$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$
27. Bromură de potasiu	119,00	KBr
28. Cianură de potasiu	65,11	KCN
29. Carbonat de potasiu	69,10	K_2CO_3
30. Clorură de potasiu	74,56	KCl
31. Cromat de potasiu	64,73*	K_2CrO_4
32. Bicromat de potasiu	49,03	$K_2Cr_2O_7$
33. Fericianură de potasiu	109,70	$K_3/Fe(CN)_6/$
34. Ferocianură de potasiu	105,70	$K_4/Fe(CN)_6/3H_2O$
35. Pirostibiat de potasiu	135,80	$K_2H_2Sb_2O_7 \cdot 6H_2O$
36. Iodură de potasiu	166,00	KI
37. Permanganat de potasiu	31,60*	$KMnO_4$
38. Azotit de potasiu	42,55*	KNO_3
39. Azotat de potasiu	101,10	KNO_3
40. Sare Seignette (tartrat de K, Na)	141,10	$KNaC_4H_4O_6 \cdot 6H_2O$
41. Sulfocianură de potasiu	97,18	$KSCN$
42. Sulfat de potasiu	87,15	K_2SO_4
43. Azotat de nichel	145,40	$Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$
44. Carbonat de magneziu	42,16	$MgCO_3$
45. Clorură de magneziu	101,72	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$
46. Sulfat de magneziu	123,30	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
47. Clorură de mangan	98,95	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$
48. Clorură mercurică	271,50*	$HgCl_2$
49. Clorură ferică	270,30*	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$
50. Sulfat feros	278,00*	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$
51. Sulfat de cupru	124,90	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
52. Anhidridă cromică	33,33*	CrO_3
53. Azotat de cobalt	145,60	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$
54. Clor	35,46*	Cl_2(sat. 0,73%)
55. Clorură de calciu	109,60	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$
56. Brom	79,92	Br_2(sat. 3,66%)
57. Azotat de argint	169,90	$AgNO_3$
58. Acetat de plumb	189,70	$Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$
59. Azotat de plumb	165,60	$Pb(NO_3)_2$
60. Clorură stanoasă	112,90	$SnCl_2 \cdot 2H_2O$
61. Sulfat de zinc	143,80	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
62. Acetat de uranil	213,20	$UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$
63. Azotat de uranil	251,20	$UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

La substanţele notate cu asterisc (*), ce intervin în reacţii de oxidoreducere, trebuie ţinut cont la calculul cantităţii (echivalentului-gram) de numărul electronilor schimbaţi (vezi pag. 31).

Scanned with OKEN Scanner

PURIFICAREA UNOR SOLVENŢI ORGANICI

1) Acetona

Acetona comercială conţine impurităţi oxidabile sau acide şi apă. Acestea pot fi îndepărtate în felul următor:

Se adaugă acetonei comerciale 2 *g* $CaCl_2$ sau $CaSO_4$ anh. pentru fiecare 100 *ml* de acetonă. Se lasă 24 ore în contact. Se distilă. Se adaugă 0,5—1 *g* $KMnO_4$ pentru fiecare 100 *ml* acetonă şi se aşteaptă cîteva ore de contact, după care se distilă. Vom avea grijă ca în permanenţă să existe un exces de $KMnO_4$ în cursul operaţiilor (soluţia să fie în permanenţă roz). Acetona pură pe care o obţinem se păstrează pe $CaCl_2$ anhidră, în flacoane brune.

Atenţie! Acetona este foarte inflamabilă; limitele de explozie în aer (la 760 *mm* Hg şi 20°C) sînt de 50—270 g/m^3; uşor toxică.

Identificarea impurităţilor:

Aldehide

5 *ml* acetonă
5 *ml* apă
5 *ml* reactiv Schiff

O culoare roşie violacee indică prezenţa aldehidelor.

Metanol

1 *ml* acetonă
5 *ml* apă
25 *ml* soluţie $KMnO_4$ 2%
0,2 *ml* H_2SO_4 conc.

Lăsăm 3 minute în repaus după care distrugem excesul de $KMnO_4$ prin adausul a 1 *ml* acid oxalic 10%. După aceea se adaugă:

1 *ml* H_2SO_4 conc.
5 *ml* reactiv Schiff

O coloraţie roşie violacee indică prezenţa formaldehidei care s-a format din metanol.

3) Acetatul de etil

Produsul comercial conţine urme de apă, etanol şi acid acetic. Pentru purificare acetatul de etil se spală cu 1 volum egal (1:1) de soluţie de Na_2CO_3 10%, 1 volum de soluţie saturată de $CaCl_2$ şi apoi de 3 ori cu un volum de apă. Solventul se usucă apoi pe K_2CO_3 anhidru şi se distilă înainte de întrebuinţare pe anhidridă fosforică 2%. Se păstrează fracţiunea care distilă între 76°—77°C, restul se aruncă.

Atenţie! vaporii săi sînt iritanţi pentru mucoase.

3) Acidul acetic glacial

Produsul comercial conţine substanţe reducătoare şi apă. Acidul acetic glacial 98% se fierbe la reflux timp de 10 ore în prezenţa unui exces de anhidridă cromică CrO_3 (4 g%); se separă cromatul şi se rectifică în prezenţă de anhidridă cromică proaspătă (30 g%) şi H_2SO_4 conc., cu reflux. Fracţiunea care distilă la 118°C este culeasă în absenţa vaporilor de apă, apoi rectificată ca mai înainte pe CrO_3.

Atenţie! este iritant al mucoaselor.

Scanned with OKEN Scanner

4) Anhidrida acetică

Anhidrida acetică se fierbe la reflux pe carbură de calciu timp de 4—6 ore pentru a elimina acidul acetic. Apoi se rectifică. Se reţine fracţiunea care trece între 139°—140°C.
Atenţie! iritantă a mucoaselor şi a pielii.

5) Benzenul

Principala impuritate este tiofenul. Impurităţi secundare sînt hidrocarburile saturate şi alchenele.

Tiofenul se elimină în felul următor: 4—5 litri de benzen se agită cu cîte 100 *ml* H_2SO_4 conc. pînă ce acesta nu se mai colorează în brun. Se spală cu NaOH sau KOH *n* (4 × 0,1 volume). Benzenului i se adaugă apoi pentru fiecare 100 *ml*, 10—20 *g* sodiu metalic sub formă de fîşii subţiri. Se lasă 24 ore în contact după care se distilă la presiune obişnuită (80°—81°C) aruncînd cca 50 *ml* distilat de la început şi de la sfîrşit. Dacă avem nevoie de benzen anhidru se evită vaporii de apă, păstrînd distilatul în flacoane brune cu dop prevăzut cu tub de $CaCl_2$ anh.

Pentru a elimina substanţele care devin fluorescente la cald în prezenţă de H_2SO_4 se recomandă încălzirea benzenului la reflux timp de 1 oră, în prezenţă de 2—3 g $AlCl_3$ pentru fiecare litru de benzen. După ce amestecul este lăsat în repaus timp de 24 ore, decantăm, spălăm cu o soluţie de K_2CO_3 (2 × 0,25 volume) şi cu apă distilată (2 × 0,25 volume). Se lasă în contact cu $CaCl_2$ o noapte, apoi distilăm într-o coloană de rectificare, în condiţiile prezentate mai înainte.
Atenţie! Foarte inflamabil, limite de explozie în aer (la 760 *mm* Hg şi 20°C) între 0,8—8 părţi la 100, foarte toxic.

Determinarea tiofenului

La un amestec de 25 *ml* benzen şi 15 *ml* acid sulfuric concentrat pur se adaugă 3 *mg* izatină, se agită bine timp de 20 de secunde. Se lasă apoi o oră în repaus. Faza acidă nu trebuie să se coloreze în albastru verzui. În caz contrar înseamnă că tiofenul este prezent.

6) Butanol normal

Purificarea butanolului normal se face astfel: la 1 litru butanol normal, se adaugă 100 *ml* de reactiv Porter şi Silber (65 *mg* clorhidrat de fenil-hidrazină-recristalizată de 2 ori din etanol în 100 *ml* amestec format din 100 *ml* H_2SO_4 diluat şi 50 *ml* etanol absolut). Se lasă în contact timp de o săptămînă. Amestecul este spălat apoi de 2 ori cu 500 *ml* apă şi răcit sub 0° timp de cîteva ore. Faza apoasă care se separă este aruncată. Se adaugă 30 g sulfat de sodiu anhidru. După ce se păstrează timp de o noapte la rece solventul care se găseşte în faza superioară este separat şi distilat. Se păstrează fracţiunea care fierbe constant la 117,8°—118°C. Această fracţiune este constituită din butanol pur. Butanolul care distilă înainte de 117°, se lasă în contact peste noapte cu Na_2CO_3 anhidru (30 g/litru) şi apoi se distilă din nou. Se culege fracţiunea care distilă la 117,8°—118°C.
Atenţie! Foarte inflamabil, toxicitate mică, dar mirosul este greu de suportat.

Criteriu de puritate

Dacă efectuăm o reacţie de culoare cu 1 *ml* butanol şi 4 *ml* reactiv Porter-Silber, densitatea optică a soluţiei măsurată în cuvă de 10 *mm* nu trebuie să depăşească 0,025.

Scanned with OKEN Scanner

7) Cloroformul

Cloroformul reacţionează cu oxigenul din aer formînd fosgen $COCl_2$, Cl_2 şi HCl. Se stabilizează prin adăugarea de etanol 0,5—1 părţi la 100 părţi cloroform şi se conservă în sticle brune bine închise.

Atenţie! Nu se încearcă niciodată deshidratarea cu Na metalic deoarece este pericol de explozie.

Cloroformul comercial se agită de 3 ori cu H_2SO_4 conc. (5 părţi acid la 100 părţi cloroform) (V/V), apoi de 2 ori cu o soluţie de NaOH *N* (20 părţi NaOH la 100 părţi cloroform) (V/V) şi în sfîrşit de 2 ori cu apă răcită la gheaţă (20 părţi apă la 100 părţi cloroform V/V). Este conservat apoi pe $CaCl_2$ topită (10 părţi $CaCl_2$ la 100 părţi cloroform) în sticle brune, umplute la maxim şi se distilă numai înainte de întrebuinţare.

Cloroformul care a servit la extragerea steroizilor poate fi recuperat în felul următor: se lasă în frigider 24 de ore în prezenţă de 2 *g* benzidină/litru de cloroform. Se distilă înainte de întrebuinţare. Se păstrează în sticle brune cu o parte etanol la 100 părţi cloroform.

Eliminarea etanolului din cloroform se face prin trecere peste o coloană de silicagel Davison (100 mesh). Dimensiunea coloanei este de 1.200/50 *mm*, închisă la partea inferioară cu un robinet, debitul de scurgere fixat fiind de 3 *ml/min*. Obţinem astfel cloroform care conţine maximum 0,01 părţi etanol la 100 părţi cloroform. Poate fi conservat în sticle brune la +2°C timp de 30 de zile fără descompunere. Silicagelul reţine în jur de 8 părţi la 100 din greutatea sa, etanol şi permite purificarea a cca 15 litri de cloroform comercial. Silicagelul este uşor recuperabil prin uscare la aer şi încălzire la 600° timp de 6 ore.

Atenţie! Cloroformul este puţin toxic (dă tulburări digestive). De notat însă că produsul comercial poate fi impurificat cu fosgen, gaz foarte toxic.

8) Eterul etilic

Eterul etilic se spală cu apă într-o pîlnie de separare, după care se usucă pe $CaCl_2$ timp de 24 de ore. Se distilă apoi pe o baie de apă (fără flacără) prinzîndu-l într-un vas răcit puternic.

Eterul etilic anhidru, se obţine prin tratarea eterului purificat ca mai sus cu bucăţele de sodiu metalic. Se lasă 2—3 zile în contact într-un recipient brun care are un tub cu $CaCl_2$ anh. adaptat la dop. După aceea se distilă ca mai sus, evitînd contactul cu vaporii de apă.

Atenţie! Este foarte inflamabil.

9) Alcool etilic absolut

Se fierbe la reflux pe baia de apă timp de două ore, 3 litri de alcool 95% şi 1 *kg* var nestins în bulgări. Se înlocuieşte apoi refrigerentul ascendent cu unul descendent şi alcoolul etilic care distilă la 78°C se prinde într-un recipient ferit de contactul direct cu aerul, printr-un tub cu $CaCl_2$. Se obţin astfel 2,6—2,7 litri alcool absolut.

Păstrarea alcoolului absolut se face în flacoane bine închise, prevăzute pe fund cu un strat de $CuSO_4$ anh. alb. Cînd aceasta se albăstreşte înseamnă că alcoolul nu mai este absolut.

Se mai poate obţine alcool absolut prin tratare cu $CuSO_4$ anh. (obţinut prin prăjirea $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ şi pulverizare); pulbere albă. Se lasă alcoolul etilic 95% în contact cu această pulbere schimbînd-o din cînd în cînd (cînd devine albastră) atunci se distilă alcoolul etilic şi se păstrează în sticle în condiţiile prevăzute mai sus.

Scanned with OKEN Scanner

SOLUȚII TAMPON

Soluțiile tampon sînt soluțiile care nu își modifică sensibil *pH*-ul cînd li se adaugă mici cantități de acizi tari sau baze tari, respectiv ioni de H^+ sau OH^-.

În general, ele sînt alcătuite dintr-un amestec al unui acid slab cu o sare a unui acid slab cu o bază tare (de obicei baza conjugată), exemplu: CH_3COOH/CH_3COONa, sau un amestec al unei baze slabe cu o sare a unei baze slabe cu un acid tare (de obicei acidul ei conjugat), exemplu: NH_4OH/NH_4Cl.

Legătura dintre *pH*-ul amestecului tampon și concentrația acidului și a sării utilizate pentru realizarea lui, se deduce din următoarea demonstrație cantitativă a comportării soluțiilor tampon.

Pentru generalizare, să considerăm următoarea soluție tampon: HA+NaA. Acidul slab va disocia astfel: $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$ aplicînd legea acțiunii maselor se obține:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad \text{de unde: } [H^+] = K_a \cdot \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Disociația acidului HA, va fi foarte mult împiedicată de prezența sării NaA, care fiind practic total disociată ($NaA \rightarrow Na^+ + A^-$) va retrograda disociația acidului prin ionii săi A^-. În aceste condiții putem considera că $[A^-] = [NaA]$ și deci [HA] nedisociat = [HA] total. Rezultă astfel că: $[H^+] = K_a \cdot \frac{[HA]}{[NaA]}$ respectiv: $[OH^-] = K_b \cdot \frac{[BOH]}{[BX]}$.

Deci *pH*-ul unei soluții tampon, depinde de raportul concentrațiilor (c) acid/sare, respectiv bază/sare, numit *raport de tamponare*, scriind ecuația lui HENDERSON-HASSELBACH obținem:

$$pH = pK_a + \log \frac{C_{sare}}{C_{acid}}$$

sau:

$$pH = pK_b + \log \frac{C_{bază}}{C_{sare}}$$

unde K_a și K_b sînt constantele de disociere a acidului, respectiv a bazei. Pentru o mai bună înțelegere să exemplificăm felul în care se stabilește *pH*-ul unei soluții tampon. Fie sistemul tampon CH_3COOH/CH_3COONa $pK_a = 4{,}7$ · *pH*-ul oricărei soluții tampon CH_3COOH/CH_3COONa se obține din relația:

$$pH = 4{,}7 + \log \frac{C_{sare}}{C_{acid}}$$

Dacă soluția este compusă din 500 *ml* CH_3COONa 0,1 *n* și 100 *ml* CH_3COOH 0,1 *n*, *pH*-ul va fi:

$$pH = 4{,}7 + \log \frac{500}{100} = 4{,}7 + \log 5 = 4{,}7 + 0{,}7 = 5{,}4$$

Scanned with OKEN Scanner

Unele tampoane conţin mai mulţi acizi, eventual mai multe săruri, pentru a mări capacitatea de tamponare a sistemului.

În cele ce urmează vom indica modul de obţinere a soluţiilor tampon.

PREPARAREA SOLUŢIILOR TAMPON

La prepararea soluţiilor tampon se va ţine seamă de următoarele:

1. Se folosesc numai reactivi foarte puri „pro analysi". Dacă se folosesc săruri anhidre acestea se vor usca 4—6 ore la 105—110°C (în funcţie de stabilitatea lor termică) şi se răcesc în exicator înainte de cîntărire.

2. Apa folosită pentru prepararea reactivilor este bidistilată sau deionizată. Pentru soluţiile diluate de tampon, apa se fierbe, în prealabil, pentru a îndepărta CO_2 dizolvat în apă.

3. La prepararea soluţiilor tampon, toate soluţiile trebuiesc standardizate cu exactitate pentru titrare.

4. Toate cîntăririle se fac la balanţa analitică.

5. *pH*-ul tampoanelor se va verifica cu ajutorul *pH*-metrului standardizat cu o soluţie tampon cu *pH* cunoscut (vezi tampoane standard) şi măsurat la temperatura la care este utilizat tamponul.

6. Este recomandabilă păstrarea tampoanelor sub formă de soluţii concentrate. Soluţiile diluate în special, se vor păstra la +4°C în sticle de polipropilenă.

7. În cazul în care tampoanele sînt folosite la intervale mai mari, este mai convenabil să cîntărim sărurile tampoanelor respective şi să le păstrăm nedizolvate în sticle mici de plastic pînă în momentul întrebuinţării. Pentru unele determinări enzimatice, amestecul tampon — substrat se poate păstra sub formă îngheţată.

8. Cînd tampoanele sînt folosite pentru determinări enzimatice nu se vor folosi substanţe conservante.

9. Pentru prepararea tampoanelor de un anumit *pH*, raportul componenţilor poate fi scos din tabele (vezi tabelele din anexă). Exemplu, pentru a obţine un tampon acid barbituric/barbiturat de sodiu la *pH* 7,30 se amestecă 19,0 *ml* din soluţia barbiturat de sodiu cu 81,0 *ml* din soluţia de acid barbituric.

CÎTEVA SOLUŢII TAMPON FOLOSITE MAI FRECVENT ÎN LABORATORUL CLINIC

Unele din soluţiile tampon menţionate sînt grupate din punct de vedere a tăriei ionice *(j)*, folosite pentru cercetări electroforetice, şi cu molaritate constantă pentru alte tipuri de cercetări.

1) Tampon citrat, 50 *mM;* molaritate constantă.

Soluţii. A) *Acid citric 0,1 M.* 21,02 g acid citric, monohidrat, se solvă în 1000 *ml* apă demineralizată.

B) *Citrat de sodiu 0,1 M.* 29,41 g citrat trisodic cu 2 molecule de apă (nu cu 5 H_2O) se solvă în apă distilată lipsită de CO_2 şi se ajustează volumul la 1000 *ml* ($t = 23°C$).

Se amestecă volumele specificate în tabel din soluţiile A şi B şi se diluează la 100 *ml* cu apă demineralizată.

Scanned with OKEN Scanner

pH	Sol. A (*ml*)	Sol. B (*ml*)	*pH*	Sol. A (*ml*)	Sol. B (*ml*)
3,0	46,5	3,5	4,6	25,5	24,5
3,2	43,7	6,3	4,8	23,0	27,0
3,4	40,0	10,0	5,0	20,5	29,5
3,6	37,0	13,0	5,2	18,0	32,0
3,8	35,0	15,0	5,4	16,0	34,0
4,0	33,0	17,0	5,6	13,7	36,3
4,0	31,5	18,5	5,8	11,8	38,2
4,4	28,0	22,0	6,0	9,5	41,5
			6,2	7,2	42,8

2) Tampon acetat; j = constant.

Soluţii. A) *Acid acetic 1,0 M.* **57,5 *ml*** acid acetic glacial se diluează cu apă demineralizată şi volumul se ajustează la 1000 *ml.* Se controlează molaritatea prin titrare cu alcalii (în prezenţă de fenolftaleină) şi eventual se ajustează.

B) *NaOH 10 M.* Se prepară o soluţie concentrată de bază: 100 *g* NaOH în 100 *ml* apă demineralizată şi liberă de CO_2 (apa se fierbe în prealabil pentru îndepărtarea CO_2). Se lasă în repaus şi se foloseşte lichidul clar supernatant. 65 *ml* soluţie de bază se diluează cu apă lipsită de CO_2 şi se completează la 1000 *ml.* Se controlează concentraţia prin titrare cu acid clorhidric (în prezenţă de roşu de metil) şi eventual se ajustează (t = 25°C).

Se amestecă volumele specificitate în tabel din soluţiile A şi B şi se diluează la 1000 *ml* cu apă demineralizată.

pH	j = 0,05 CH_3COOH 1,0 *M* + 50 *ml* NaOH 1,0 *M*	j = 0,1 CH_3COOH 1,0 *M* + 100 *ml* NaOH 1,0 *M*	j = 0,2 CH_3COOH 1,0 *M* + 200 *ml* NaOH 1,0 *M*
	A(*ml*)	A(*ml*)	A(*ml*)
3,6	650	—	—
3,8	428	828	—
4,0	288	559	—
4,2	200	389	760
4,4	145	283	553
4,6	110	215	423
4,8	87,7	173	341
5,0	73,8	146	289
5,2	65,0	129	256
5,4	59,5	118	235
5,6	56,0	112	222
5,8	53,8	107	

3) Tampon acetat pH = 3,5—5,6

Soluţii. A) 11,55 *ml* acid acetic glacial se diluează la 1000 *ml* cu apă demineralizată. Se obţine astfel o soluţie 0,2 *M.*

Scanned with OKEN Scanner

B) 16,41 *g* acetat de sodiu anhidru (CH_3COONa) sau 27,22 *g* acetat de sodiu cristalizat ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) se solvă în 1000 *ml* apă demineralizată. Se obţine o soluţie 0,2 *M*.

Se amestecă volumele specificate în tabel din soluţiile A şi B şi se diluează la 100 *ml* cu apă demineralizată.

pH final	*ml* sol. A	*ml.* sol. B.
3,6	46,3	3,7
3,8	44,0	6,0
4,0	41,0	9,0
4,2	36,8	13,2
4,4	30,5	19,5
4,6	25,5	24,5
4,8	20,0	30,0
5,0	14,8	35,2
5,2	10,5	39,5
5,4	8,8	41,2
5,6	4,8	45,2

4) Tampon Walpole CH_3COONa—HCl pH = 0,65—5,2.

Soluţii. A) 82,04 *g* CH_3COONa anhidru se solvă în apă demineralizată şi se completează la 1000 *ml.* Se obţine astfel o soluţie 0,1 *M*.

B) Acid clorhidric 1,0 *M* verificat prin titrare.

Se amestecă 100 *ml* din soluţia *A*, cu volumele din soluţia B trecute în tabel şi se completează cu apă demineralizată pînă la 500 *ml.* Se obţine *pH*-urile din tabel.

pH final	*ml.* sol. B.
0,65	200
0,91	160
1,09	140
1,24	130
1,42	120
1,71	110
1,99	105
2,32	102
2,72	99,5
3,09	97,0
3,29	95,0
3,50	92,5
3,79	85
3,95	80
4,19	70
4,58	50
4,76	40
4,92	30
5,20	20

5) Tampon acetat-veronal-HCl Michaelis, pH = 2,62—9,16z

Soluţii. A) 19,428 *g* acetat de sodiu cristalizat ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) sau 11,704 *g* sare anhidră şi 29,428 *g* veronal (dietilbarbiturat de sodiu) se solvă în apă demineralizată şi liberă de CO_2 şi se completează la 1000 *ml.*

Scanned with OKEN Scanner

B) Acid clorhidric 0,1 *n* verificat prin titrare (8,4 *ml* HCl conc. şi apă demineralizată pînă la 1000 *ml*).

Se amestecă volumele din soluţiile A şi B specificate în tabel.

pH	*ml.* sol. A	*ml.* sol. B	H_2O dist. $-CO_2$
2,62	5	16	2
3,20	5	15	3
3,62	5	14	4
3,88	5	13	5
4,13	5	12	6
4,33	5	11	7
4,66	5	10	8
4,93	5	9	9
5,32	5	8	10
6,12	5	7	11
6,75	5	6,5	11,5
6,99	5	6	12
7,25	5	5,5	12,5
7,42	5	5	13
7,66	5	4	14
8,18	5	2	16
9,16	5	0,25	17,75

6) Tampon maleat

Soluţii. A) *Maleat de sodiu* 0,2 *M*. 23,22 *g* acid malic sau 19,61 *g* anhidridă maleică se solvă în NaOH 0,2 *n* şi volumul se completează cu apă demineralizată la 100 *ml*.

B) *Hidroxid de sodiu 0,2 M*. Se prepară o soluţie concentrată de bază pleçînd de la 100 *g* NaOH care se solvă în 100 *ml* apă demineralizată liberă de CO_2. Se lasă în repaus şi se foloseşte lichidul supernatant limpede. 13 *ml* din soluţia concentrată, de bază, se diluează la 1000 *ml* cu apă demineralizată lipsită de CO_2. Concentraţia se controlează prin titrare cu HCl (indicator roşu de metil). Eventual soluţia se ajustează.

50 *ml* maleat monosodic 0,2 *M* se tratează cu volumele de NaOH 0,2 *M* prevăzute în tabel la $t = 23°C$ şi se diluează la 1000 *ml* cu apă demineralizată. Se obţin valorile de *pH* specificate în tabel:

pH	B(*ml*)	*pH*	B(*ml*)
5,2	7,2	6,0	26,9
5,4	10,5	6,2	33,0
5,6	15,3	6,4	38,0
5,8	20,8	6,6	41,6
		6,8	44,4

Scanned with OKEN Scanner

7) Tampon ftalat-HCl pH = 2,2—3,8

Soluţii. A) 40,85 g ftalat acid de potasiu (HOOC—C_6H_4—COOK) se solvă în 1000 *ml* apă demineralizată. Se obţine o soluţie 0,2 *M*.

B) Soluţia HCl 0,2 *M*.

50,0 *ml* soluţie A se amestecă cu volumele indicate în tabel din soluţia B şi se completează cu apă demineralizată la 200 *ml* pentru a se obţine valorile de *pH* specificate în tabel

pH final	*ml.* sol. B
2,2	46,7
2,4	39,6
2,6	33,0
2,8	26,4
3,0	20,3
3,2	14,7
3,4	9,9
3,6	6,0
3,8	2,6

8) Tampon ftalat — NaOH pH=4,2—6,0

Soluţii. A) 40,85 g ftalat acid de potasiu (HOOC—CH_2—COOK) se solvă în 1000 *ml* apă demineralizată. Se obţine astfel o soluţie 0,2 *M*.

B) Soluţie de NaOH 0,2 *M*.

50 *ml* soluţie A se amestecă cu volumele specificate în tabel din soluţia B şi se completează cu apă distilată pînă la 200 *ml* pentru a obţine *pH*-urile specificate în tabel.

pH final	*ml.* sol. B
4,2	3,7
4,4	7,5
4,6	12,2
4,8	17,7
5,0	23,8
5,2	30,0
5,4	35,5
5,6	39,9
5,8	43,0
6,0	45,5

9) Tampon fosfat (j = constant)

Soluţii. A) *Fosfat monopotasic 0,5 M.* 68,05 g KH_2PO_4 se solvă în apă demineralizată şi volumul se completează la 1000 *ml* (fosfatul se usucă în prealabil timp de 1—2 ore la 110°C).

B) *Fosfat disodic 0,5 M.* 70,99 g Na_2HPO_4 se solvă în apă demineralizată lipsită de CO_2 şi se diluează la 1000 *ml* (fosfatul se usucă în prealabil timp de 1—2 ore la 110°C).

Se amestecă volumele specificate în tabel din soluţiile A şi B la 25°C şi se completează la 1000 *ml* cu apă demineralizată. Se vor obţine valorile de *pH* specificate în tabel.

Scanned with OKEN Scanner

pH	$j = 0,05$		$j = 0,1$		$j = 0,2$	
	A(*ml*)	B(*ml*)	A(*ml*)	B(*ml*)	A(*ml*)	B(*ml*)
5,6	—	—	—	—	333	22,4
5,8	—	—	159	13,8	303	32,4
6,0	74,2	8,58	142	19,5	265	44,8
6,2	64,6	11,8	121	26,4	222	59,4
6,4	53,4	15,5	98,2	34,0	176	74,6
6,6	42,0	19,3	75,6	41,4	133	89,2
6,8	31,4	22,8	55,4	48,2	95,2	102
7,0	22,4	25,8	39,0	53,6	65,8	111
7,2	15,4	28,2	26,4	57,8	44,2	119
7,4	10,3	30,0	17,6	60,8	29,2	124
7,6	6,74	31,0	11,5	62,8	18,9	127
7,8	4,36	31,8	7,38	64,2	12,1	129
8,0	2,80	32,4	—	—	—	—

10) Tampon fosfat după Sörensen 66,7 mM (isotonic)

Soluţii. A) *Fosfat monopotasic 66,7 mM.* KH_2PO_4 se usucă 1—2 ore la 110°C. 9,08 g de KH_2PO_4 se solvă în apă demineralizată şi lipsită de CO_2 şi se diluează la 1000 *ml.*

B) *Fosfat disodic 66,7 mM.* Sarea anhidră se usucă 1—2 ore la 110°C. 9,479 g Na_2HPO_4 se solvă în apă demineralizată şi lipsită de CO_2. Se completează la 1000 *ml.*

Se amestecă volumele indicate în tabel, din soluţiile A şi B şi se aduce la 100 *ml* cu apă demineralizată. *pH*-ul indicat în tabel corespunde de la o temperatură de lucru $t = 18°C$.

pH	A	B	pH	A	B
5,0	98,8	1,2	6,8	50,8	49,2
5,2	98,0	2,0	7,0	39,2	60,8
5,4	96,7	3,3	7,2	28,5	71,5
5,6	94,8	5,2	7,4	19,6	80,4
5,8	91,9	8,1	7,6	13,2	86,8
6,0	87,7	12,3	7,8	8,6	91,4
6,2	81,5	18,5	8,0	5,5	94,5
6,4	73,2	26,8	8,2	3,3	96,7
	62,7	37,3			

11) Tampon fosfat pH = 5,7—8,0

Soluţii. A) 27,6 g fosfat monobazic ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) se solvă în 1000 *ml* de apă. Se obţine o soluţie 0,2 *M.*

B) 28,39 g fosfat bibazic (Na_2HPO_4) sau 53,62 g fosfat bibazic cristalizat ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) se solvă în 1000*ml* apă distilată. Se obţine o soluţie 0,2 *M.*

Scanned with OKEN Scanner

Se amestecă conform tabelului, volume diferite din soluţiile A şi B. Se obţin valorile de *pH* indicate în tabel.

pH final	*ml.* sol. A	*ml.* sol. B
5,7	93,5	6,5
5,8	92,0	8,0
5,9	90,0	10,0
6,0	87,7	12,3
6,1	85,0	15,0
6,2	81,5	18,5
6,3	77,5	22,5
6,4	73,5	26,5
6,5	68,5	31,5
6,6	62,5	37,5
6,7	56,5	43,5
6,8	51,0	49,0
6,9	45,0	55,0
7,0	39,0	61,0
7,1	33,0	67,0
7,2	28,0	72,0
7,3	23,0	77,0
7,4	19,0	81,0
7,5	16,0	84,0
7,6	13,0	87,0
7,7	10,5	90,5
7,8	8,5	91,5
7,9	7,0	93,0
8,0	5,3	94,7

12) Tampon barbituric pH = 6,8—9,2

Soluţii. A) 41,2 *g* dietilbarbiturat de sodiu (veronal sodic sau medinal) se solvă în 1000 *ml* de apă demineralizată. Se obţine o soluţie 0,2 *M*.

B) Soluţie acid clorhidric 0,2 *M*. 50,0 *ml* din soluţia A se amestecă cu volumele din soluţia B specificate în tabel şi se completează cu apă demineralizată la 200 *ml*. Se obţin astfel *pH*-urile indicate în tabel.

pH final	*ml.* sol. B	*pH* final	*ml.* sol. B
6,8	45,0	8,0	17,5
7,0	43,0	8,2	12,7
7,2	39,0	8,4	9,0
7,4	32,5	8,6	6,0
7,6	27,5	8,8	4,0
7,8	22,5	9,0	2,5
		9,2	1,5

13) Acid barbituric-barbiturat de sodiu (pH = 7,0—8,9)

Soluţii. A) 8,24 *g* dietilbarbiturat de sodiu pur (veronal sodic) se solvă în apă demineralizată şi se completează la 1000 *ml*. Se obţine astfel o soluţie 0,04 *M*.

B) 7,36 *g* acid dietilbarbituric pur (veronal) se solvă în apă demineralizată şi se completează la 1000 *ml*. Soluţia se obţine prin încălzire uşoară şi amestecare constantă. Se foloseşte de obicei un agitator magnetic cu placă încălzită. Soluţia astfel preparată este 0,04 *M*.

Scanned with OKEN Scanner

Volumele indicate în tabel din soluţiile A şi B se amestecă pentru a obţine *pH*-urile dorite. *pH*-urile din tabel corespund pentru o temperatură de 25°C. Pentru a se obţine valorile de *pH* la o temperatură de 37°C, se scot 0,1 unităţi.

pH final	*ml.* sol. A	*ml.* sol. B
7,0	10,0	90,0
7,1	12,5	87,5
7,2	15,5	84,5
7,3	19,0	81,0
7,4	22,5	77,5
7,5	26,0	74,0
7,6	30,0	70,0
7,7	34,5	65,5
7,8	39,5	60,5
7,9	44,5	55,5
8,0	50,0	50,0
8,1	57,5	42,5
8,2	65,0	35,0
8,3	72,0	28,0
8,4	76,5	23,5
8,5	80,0	20,0
8,6	83,0	17,0
8,7	85,5	14,5
8,8	88,0	12,0
8,9	90,0	10,0

14) Tampon dietilbarbituric-dietilbarbiturat de sodiu (j = constant)

Soluţii. A) *Acid dietilbarbituric 0,025 M.* Substanţa se recristalizează din alcool etilic şi se usucă în vid pe P_2O_5. 4,604 *g* acid dietilbarbituric se solvă în apă demineralizată şi se aduce la 1000 *ml.*

B) *Dietilbarbiturat de sodiu 0,5 M.* Recristalizare: 100 *g* substanţă se dizolvă în 300 *ml* apă caldă, se filtrează, se adaugă 300 *ml* etanol. Se răceşte la 5°C şi se filtrează. Se usucă pe P_2O_5 în vid. 103,09 *g* dietilbarbiturat de sodiu se solvă în apă demineralizată şi lipsită de CO_2 şi se aduce la 1000 *ml.* Soluţia se conservă prost (descompunere).

C) *Soluţie de NaCl 0,5 M.* 29,25 *g* NaCl se solvă în 1000 *ml* apă demineralizată. Se amestecă volumele indicate în tabel din soluţiile A, B şi C, la t = 25°C şi se aduce cu apă demineralizată la 1000 *ml.*

pH t=25 °C	j = 0,05			j = 0,1			j = 0,2		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
7,4	648	10	90	639	10	190	275	5	395
7,6	409	10	90	403	10	190	348	10	390
7,8	645	25	75	636	25	175	219	10	390
8,0	814	50	50	401	25	175	346	25	375
8,2	514	50	50	506	50	150	218	25	275
8,4	648	100	—	639	100	100	275	50	350
8,6	409	100	—	403	100	100	348	100	300
8,8	258	100	—	509	200	—	438	200	200
9,0	163	100	—	321	200	—	277	200	200

Scanned with OKEN Scanner

15) Tampon glicocol (glicină). j=constant.

Soluţii. A) *Glicocol 2,0 M.* Substanţa se usucă la 110°C timp de 1—2 ore. 150,14 *g* glicocol se solvă în apă demineralizată şi se aduce la 1000 *ml.*

B) *Soluţie NaOH 1,0 n.* (preparare vezi pct. 2.).

Se amestecă soluţiile A şi B în volumele indicate în tabel şi se diluează la 1000 *ml* cu apă demineralizată.

pH t = 25 °C	*j* = 0,05 glicocol 2,0 *M* + + 50 *ml* NaOH 1,0 *M* 1,0 *M*	*j* = 0,1 glicocol 2,0 *M* + + 100 *ml* NaOH 1,0 *M*	*j* = 0,2 glicocol 2,0 *M* + + 200 *ml* NaOH 1,0 *M*
	A	A	A
8,8	234	467	—
9,0	157	313	633
9,2	108	216	437
9,4	77,4	155	312
9,6	58,1	116	234
9,8	45,8	91,7	185
10,0	38,1	76,3	153
10,2	33,2	66,5	134
10,4	30,1	60,3	121
10,6	28,0	56,4	113
10,8	26,7	53,8	108

16) Tampon glicocol (glicină) pH = 8,6—10,6

Soluţii. A) 15,01 *g* glicocol pur ($H_2N—CH_2—COOH$) se solvă în apă demineralizată şi se completează la 1000 *ml.* Se obţine astfel o soluţie 0,2 *M.*

B) Soluţie de NaOH 0,2 *M.*

50,0 *ml* soluţie A se amestecă cu volumele din soluţia A indicate în tabel şi se completează cu apă demineralizată la 200 *ml.*

pH final	*ml.* sol. B
8,6	4,0
8,8	6,0
9,0	8,8
9,2	12,0
9,4	16,8
9,6	22,4
9,8	27,2
10,0	32,0
10,2	38,6
10,4	42,6
10,6	45,5

17) Glicocol—NaOH—NaCl pH = 8,4—12,8

Soluţii. A) 7,505 *g* glicocol (glicină) pur şi 5,85 *g* NaCl pur se solvă în apă şi se completează la 1000 *ml* cu apă distilată. Se obţine o soluţie 0,1 *M* raportată la ambele substanţe.

Scanned with OKEN Scanner

B) Soluţie NaOH 0,1 *M*.

Se amestecă soluţiile A şi B în proporţiile menţionate în tabel pentru a obţine valorile de *pH* indicate în tabel (pentru 25°C).

pH final	*ml.* sol. A	*ml.* sol. B
8,4	95,0	5,0
8,7	90,0	10,0
9,1	80,0	20,0
9,5	70,0	30,0
9,9	60,0	40,0
10,3	55,0	45,0
10,8	51,0	49,0
11,1	50,0	50,0
11,4	49,0	51,0
11,8	45,0	55,0
12,2	40,0	60,0
12,4	30,0	70,0
12,6	20,0	80,0
12,8	10,0	90,0

18) Tampon glicocol—HCl pH = 2,2—3,6

Soluţii. A) 15,01 *g* glicocol (glicină) ($H_2N—CH_2—COOH$) se solvă în 1000 *ml* apă demineralizată. Se obţine astfel o soluţie 0,2 *M*.

B) Soluţie HCl 0,2 *M*.

50,0 *ml* soluţie A se amestecă cu volumele specificate în tabel din soluţia B şi se completează cu apă demineralizată la 200 *ml*. Se obţin valorile de *pH* indicate în tabel (pentru $t = 25°C$).

pH final	*ml.* sol. B	*pH* final	*ml.* sol. B
2,2	44,0	3,0	11,4
2,4	32,4	3,2	8,2
2,6	24,2	3,4	6,4
2,8	16,8	3,6	5,0

19) Tampon HCl—KCl pH = 1,0—2,2

Soluţii. A) 14,91 *g* KCl se solvă în 1000 *ml* apă demineralizată. Se obţine o soluţie 0,2 *M*.

B) 116,6 *ml* HCl concentrat se diluează la 1000 *ml* cu apă demineralizată. Se obţine o soluţie 0,2 *M* care se verifică prin titrare:

50 *ml* din soluţia A, se amestecă cu volumele din soluţia B specificate în tabel şi se completează cu apă distilată pînă la 200 *ml*.

pH final	*ml.* sol. B	*pH* final	*ml.* sol. B
1,0	97,0	1,7	20,6
1,1	78,0	1,8	16,6
1,2	64,5	1,9	13,2
1,3	51,0	2,0	10,6
1,4	41,5	2,1	8,4
1,5	33,3	2,2	6,7
1,6	26,3		

Scanned with OKEN Scanner

20) Tampon tris—HCl pH = 7,2—9,0

Soluţii. A) 24,2 g tris-(hidroximetil)-amino-metan (TRIS; THAM) ($C_4H_{11}NO_3$) se solvă în 1000 *ml* apă demineralizată. Se obţine o soluţie 0,2 *M*.

B) Soluţie HCl 0,2 *M*.

50,0 *ml* soluţie A se amestecă cu volumele indicate în tabel din soluţia A şi se completează cu apă demineralizată la 200 *ml*. Se obţin *pH*-urile indicate în tabel.

pH final	*ml.* sol. B	*pH* final	*ml.* sol. B
7,2	44,2	8,2	21,9
7,4	41,4	8,4	16,5
7,6	38,4	8,6	12,2
7,8	32,5	8,8	8,1
8,0	26,8	9,0	5,0

21) Tampon tris—HCl 50 mM; molaritate constantă.

Soluţii. A) Soluţie HCl 0,1 *M*. 9 *ml* HCl concentrat (36%) se diluează cu apă demineralizată la 1000 *ml*. Concentraţia se controlează prin titrare cu NaOH în prezenţă de roşu de metil. Eventual se ajustează.

B) Tris-(hidroximetil)-aminometan 0,2 *M*. Recristalizarea se face ca la tamponul tris-HCl cu j = constant. 24,23 g tris se solvă în apă demineralizată şi liberă de CO_2. Final volumul se completează la 1000 *ml*.

25 *ml* tris 0,2 *M* se tratează cu volumele de HCl 0,1 *M* indicate în tabel şi se completează cu apă demineralizată la 1000 *ml*.

HCl 0,1 *M* *ml.*	*pH* (dorit)		HCl 0,1 *M* *ml*	*pH* (dorit)	
	23 °C	37 °C		23 °C	37 °C
5,0	9,10	8,95	27,5	8,05	7,90
7,5	8,92	8,78	30,0	7,96	7,82
10,0	8,74	8,60	32,5	7,87	7,73
12,5	8,62	8,48	35,0	7,77	7,63
15,0	8,50	8,37	37,5	7,66	7,52
17,5	8,40	8,27	40,0	7,54	7,40
20,0	8,32	8,18	42,5	7,36	7,22
22,5	8,23	8,10	45,0	7,20	7,05
25,0	8,14	8,00	—	—	—

22) Tampon tris 0,74 M. pH = 8,5 pentru glucozo-6-fosfat dehidrogenază.

1,79 g tris-(hidroximetil)-aminometan (TRIS, THAM, $(CH_2OH)_3—C—NH_2$) se solvă în 50 *ml* apă demineralizată şi se agită cu un agitator magnetic. Se adaugă 14,4 *ml* HCl 2,96 *M* (obţinut prin diluarea a 24 *ml* HCl concentrat cu apă demineralizată pînă la 100 *ml*). Se amestecă bine. Se controlează *pH*-ul cu un *pH*-metru

Scanned with OKEN Scanner

sau cu hîrtie indicator de *pH*. Se ajustează la *pH* = 8,5 prin adaus de mici cantităţi de HCl 2,95 *M*. Final se aduce la 200 *ml* cu apă demineralizată. Se controlează din nou *pH*-ul cu un *pH*-metru.

23) Tampon acid boric-borat pH = 7,6--9,2

Soluţii.

A) 12,36 g acid boric pur se solvă în apă demineralizată şi se completează la 1000 *ml*. Se obţine astfel o soluţie 0,2 *M*.

B) 19,07 g borax (tetraborat de sodiu, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) se solvă în apă demineralizată şi se completează la 1000 *ml*.

50 *ml* din soluţia A se amestecă cu volumele din soluţia B specificate în tabel şi se completează cu apă demineralizată la 200 *ml*. Se obţin astfel valorile de *pH* indicate în tabel.

pH final	*ml*. sol. B	*pH* final	*ml*. sol. B
7,6	2,0	8,7	22,5
7,8	3,1	8,8	30,0
8,0	4,9	8,9	42,5
8,2	7,3	9,0	59,0
8,4	11,5	9,1	83,0
8,6	17,5	9,2	115,0

24) Tampon carbonat de sodiu-bicarbonat pH =9,2—10,7

Soluţii. A) 21,2 g carbonat de sodiu anhidru (Na_2CO_3) se solvă în apă demineralizată şi se completează la 1000 *ml*. Se obţine astfel o soluţie 0,2 *M*.

B) 16,8 g bicarbonat de sodiu pur ($NaHCO_3$) se solvă în apă demineralizată şi se completează la 1000 *ml*. Se obţine astfel o soluţie 0,2 *M*.

Se amestecă soluţiile A şi B în volumele indicate în tabel şi final se diluează la 200 *ml* cu apă demineralizată. Se obţin *pH*-urile corespunzătoare din tabel.

pH final	*ml*. sol. A	*ml*. sol. B	*pH* final	*ml*. sol. A	*ml*. sol. B
9,2	4,0	46,0	10,0	27,5	22,5
9,3	7,5	42,5	10,1	30,0	20,0
9,4	9,5	40,5	10,2	33,0	17,0
9,5	13,0	37,0	10,3	35,5	14,5
9,6	16,0	34,0	10,4	38,5	11,5
9,7	19,5	30,5	10,5	40,5	9,5
9,8	22,0	28,0	10,6	42,5	7,5
9,9	25,0	25,0	10,7	45,0	5,0

25) Tampon tris-acid maleic pH =5,08—8,45 (GOMORI)

Soluţii. A) 116,0 g acid maleic (HOOC—CH = CH—COOH) se solvă în apă demineralizată şi se completează la 1000 *ml*. Se obţine o soluţie 0,1 *M*.

B) 121,0 *g* tris-(hidroximetil)-aminometan [$(CH_2OH)_3—C—NH_2$] se solvă în apă demineralizată şi se completează la 1000 *ml*. Se obţine o soluţie 0,1 *M*.

C) Soluţie de NaOH 0,5 *M*.

Se amestecă soluţiile A, B şi C în proporţiile, din tabel. Se obţin valorile de *pH* indicate.

Scanned with OKEN Scanner

pH	*ml.* sol. A	*ml.* sol. B	*ml.* sol. C	*ml.* apă distilată
5,08	5	5	1	39
5,30	5	5	2	38
5,52	5	5	3	37
5,70	5	5	4	36
5,88	5	5	5	35
6,05	5	5	6	34
6,27	5	5	7	33
6,50	5	5	8	32
6,86	5	5	9	31
7,20	5	5	10	30
7,50	5	5	11	29
7,75	5	5	12	28
7,97	5	5	13	27
8,15	5	5	14	26
8,30	5	5	15	25
8,45	5	5	16	24

26) Tampon collidină 50 mM. Molaritate constantă

Soluţii. A) *Acid clorhidric 0,1 M.* 9 *ml* HCl (36%) se diluează cu apă demineralizată la 100 *ml.* Concentraţia se controlează prin titrare cu NaOH în prezenţă de roşu de metil. Eventual se ajustează.

B) *Collidină 0,2 M.* 27 *ml* collidină se solvă în 1000 *ml* apă demineralizată şi lipsită de CO_2 Concentraţia se controlează prin titrare cu HCl în prezenţă de metiloranj. Eventual se ajustează 25 *ml* collidină 0,2 *M* se tratează cu volumele specificate în tabel de HCl 0,1 *M* şi se diluează cu apă demineralizată la 1000 *ml.*

HCl 0,1 *M* *ml*	*pH* (dorit)		HCl 0,1 *M* *ml*	*pH* (dorit)	
	23 °C	37 °C		23 °C	37 °C
5,0	8,35	8,25	27,5	7,30	7,23
7,5	8,18	8,10	30,0	7,22	7,14
10,0	8,00	7,94	32,5	7,13	7,05
12,5	7,88	7,80	35,0	7,03	6,95
15,0	7,77	7,70	37,5	6,92	6,84
17,5	7,67	7,60	40,0	6,80	6,72
20,0	7,57	7,50	42,5	6,62	6,54
22,5	7,50	7,40	45,0	6,45	6,37
25,0	7,40	7,32	—	—	—

27) Tampon trietanolamină HCl—EDTA, pH = 7,6

(trietanolamină-HCl 50 *mM*, EDTA 5 *mM*)

7,6 *g* trietanolamină (redistilată) + 15 *ml* HCl 2,0 *M* + 2 *g* etilendiamintetraacetat disodic dihidratat (EDTA), se solvă în apă demineralizată şi se aduce la 1000 *ml.* Este preferabil să se folosească vase din cuarţ sau plastic.

Scanned with OKEN Scanner

28) *Tampon Tris—HCl. j = constant*

Soluţii. A) *Tris-(hidroximetil)-aminometan 1,0 M.* Amina se recristalizează dizolvînd 500 *g* în 250 *ml* apă demineralizată şi 600 *ml* metanol şi se încălzeşte. Se filtrează prin filtru de cărbune, se răceşte şi se filtrează. 121,14 *g* din substanţa recristalizată se solvă în apă demineralizată şi lipsită de CO_2 şi se aduce la 1000 *ml*. Se controlează prin titrare cu HCl în prezenţă de metiloranj. Eventual se ajustează.

B) *Soluţie HCl 1,0 M.* 90 *ml* HCl (36%) se diluează cu apă demineralizată la 1000 *ml*. Concentraţia se controlează prin titrare cu NaOH în prezenţă de roşu de metil. Eventual se ajustează.

Se amestecă volumele indicate în tabel din soluţiile A şi B şi se aduce cu apă demineralizată la 1000 *ml*. Se obţin *pH*-urile corespunzătoare din tabel pentru $t = 25°C$.

pH	$j = 0{,}05$ 50 *ml* HCl 1,0 *M* + *ml* Tris 1,0 *M*	$j = 0{,}1$ 100 *ml* HCl 1,0 *M* + *ml* Tris 1,0 *M*	$j = 0{,}2$ 200 *ml* HCl 1,0 *M* + *ml* Tris 1,0 *M*
	B (*ml*)	B (*ml*)	B (*ml*)
7,0	53,6	107	214
7,2	55,7	111	222
7,4	59,1	118	235
7,6	64,4	128	257
7,8	72,9	144	290
8,0	86,1	169	342
8,2	107	208	421
8,4	141	270	550
8,6	194	367	738
8,8	279	524	—
9,0	414	761	—
9,2	627	—	—

Scanned with OKEN Scanner

Borat de Na/NaOH

a) 12,404 *g* HBO_3 + 100 *ml* NaOH 1 *n* apă ad 1000 *ml* sol = borat de sodiu 0,2 *M*
b) NaOH 0,1 *N*
Borat de Na/NaOH, *pH* = 9,25 — 10,75 (T = 20°; T — 0,032 — 0,009) vol. —% NaOH în amestec

pH	0,	,05	,10	,15	,20	,25	,30	,35	,40	,45	,50	,55	,60	,65	,70	,75	,80	,85	.90	,95
9	—	—	—	—	—	3,6	8,9	12,4	15,4	18,2	21,0	23,9	26,8	29,8	32,3	34,5	36,3	37,7	39,0	40,2
10	41,0	41,9	42,7	43,4	44,0	44,6	45,2	45,8	46,3	46,8	47,2	47,6	48,0	48,3	48,6	48,8	—	—	—	—

Imidazol HCl

a) 13,62 *g* imidazol apă ad 1000 *ml* = 0,2 *M*
b) HCl 0,1 *n*
Imidazol/HCl, *pH* = 6,2 — 7,8 (T = 25°) *ml* HCl 0,1 *n* 25 *ml* sol. imidazol 0,2 *M* şi se completează cu apă la 1000 *ml*.

pH	·0	·05	·10	·15	·20	·25	·30	·35	·40	·45	·50	·55	·60	·65	·70	·75	·80	·85	·90	·95
6	—	—	—	—	42,9	42,2	41,5	40,6	39,8	38,8	37,8	36,7	35,5	34,5	33,0	31,7	30,4	29,0	27,4	25,7
7	24,3	22,8	21,3	19,8	18,6	17,3	16,0	14,8	13,6	12,5	11,4	10,4	9,3	8,4	7,5	6,7	6,0	—	—	—

Acid boric/ borax

a) 12,404 *g* HBO_3 + 2,925 *g* NaCl ad apă 1000 *ml* sol. = acid boric 0,2 *M* + NaCl 0,05 *M*
b) 19,108 *g* $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ad 1000 *ml* sol. = borax 0,05 *M*
Acid boric/borax, *pH* 7,65 — 9,0 (T = 18°) Vol. —/Na borat în amestec

pH	,0	,05	,10	,15	,20	,25	,30	,35	,40	,45	,50	,55	,60	,65	,70	,75	,80	,85	,90	,95
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16,3	17,6	19,1	20,6	22,1	23,7	25,3
8	17,1	28,9	30,8	32,8	35,0	37,2	39,4	42,0	44,4	47,0	49,4	52,0	55,0	57,9	60,7	63,8	67,2	70,0	74,9	77,8
9	81,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Borat de sodiu/HCl

a) 12,404 *g* HBO_3 + 100 *ml* NaOH 1 *n* apă ad 1000 *ml* = borat de Na 0,2 *M*
b) HCl 0,1 *M*
Borat de Na/HCl, *pH* = 7,75 — 9,15 (T = 20°, T — 0,003 — 0,006) Vol. —% HCl în amestec

pH	·0	·05	·10	·15	·20	·25	·30	·35	·40	·45	·50	·55	·60	·65	·70	·75	·80	·85	·90	·95
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	47,1	46,6	46,0	45,3	44,7
8	44,1	43,5	42,8	42,2	41,3	40,4	39,3	38,1	37,0	35,9	34,7	33,4	32,0	30,6	28,8	26,8	24,5	22,0	19,5	17,0
9	14,4	11,2	8,1	5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Scanned with OKEN Scanner

Acid boric + KCl/Na_2CO_3 (tampon Atkins-Pantiu)

a) 12,404 *g* HBO_3 + 14,912 *g* KCl apă ad 1000 *ml* = HBO_3 0,2 *M* + KCl 0,2 *M*;
b) 21,200 *g* Na_2CO_3, anhidru, apă ad 1000 *ml* = 0,2 *M*
Acid boric + KCl/Na_2CO_3, *pH* = 8,25 — 10,35 (TO 16°) vol. —% Na_2CO_3 în amestec

pH	·0	·05	·10	·15	·20	·25	·30	·35	·40	·45	·50	·55	·60	·65	·70	·75	·80	·85	·90	·95
8	—	—	—	—	—	16,0	17,1	18,2	19,3	20,2	21,8	23,0	24,3	25,8	27,4	29,0	30,6	32,1	33,7	35,3
9	37,0	38,7	40,2	42,0	43,6	45,3	47,0	48,7	50,4	52,2	54,0	55,6	57,2	58,8	60,5	62,1	63,9	65,6	67,3	69,0
10	70,9	72,6	74,5	76,3	78,0	79,8	81,7	83,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Acid citric/fosfat disodic Na_2HPO_4

a) 21,008 *g* acid citric, monohidrat, ad apă 1000 *ml* = 0,1 *M*
b) 200 *ml* H_3PO_4 1 *M* + 400 *ml* NaOH 1 *n* + 400 *ml* H_2O = Na_2HPO_4 0,2 *M* sau 35,598 *g* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ad 1000 *ml* cu apă = 0,2 *M*
Ac. citric/Na_2HPO_4, *pH* = 3,0 — 7,8 (T = 21°) vol. —% Na_2HPO_4 în amestec

pH	,0	,05	,10	,15	,20	,25	,30	,35	,40	,45	,50	,55	,60	,65	,70	,75	,80	,85	,90	,95
3	20,6	21,6	22,6	23,6	24,7	25,6	26,6	27,5	28,5	29,4	30,3	31,1	32,2	33,1	33,9	34,7	35,5	36,3	37,1	37,8
4	38,6	39,3	40,0	40,7	41,4	42,1	42,7	43,4	44,0	44,8	45,4	46,1	46,7	47,4	48,0	48,7	49,3	49,9	50,4	50,9
5	51,5	52,0	52,6	53,1	53,6	54,2	54,7	55,2	55,8	56,4	56,9	57,5	58,0	58,6	59,2	59,8	60,5	61,1	61,8	62,5
6	63,2	63,9	64,6	65,4	66,1	66,9	67,7	68,5	69,3	70,2	71,0	71,9	72,8	73,8	74,8	76,1	77,2	78,6	79,8	81,2
7	82,4	—	—	—	86,9	—	—	—	90,7	—	—	—	93,6	—	—	—	95,7	—	—	—

Ftalat acid de potasiu/NaOH

a) 40,836 *g* ftalat acid de potasiu ad apă 1000 *ml* = 0,2 *M*
b) NaOH 0,2 *n* (liber de carbonat) (se va lucra cu apă lipsită de CO_2)
Ftalat acid de K/NaOH, *pH* = 4,2—6,1 (T = 21°) *ml* NaOH ; 50 *ml* ftalat acid de K ad 200 *ml* cu H_2O

pH	·0	·05	·10	·15	·20	·25	·30	·35	·40	·45	·50	·55	·60	·65	·70	·75	·80	·85	·90	·95
4	—	—	—	—	3,7	4,57	5,50	6,47	7,50	8,55	9,65	10,9	12,1	13,5	14,8	16,2	17,7	19,8	20,7	22,3
5	23,8	25,4	27,0	28,5	30,0	31,4	32,9	34,2	35,5	36,7	37,8	38,9	39,9	40,7	41,6	42,3	43,0	43,6	44,3	44,9
6	45,4	45,9	46,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. Richterich, R., *Chimie Clinique théorique et practique*, Doin, Paris, 1967.
2. Rauen, H. N., *Biochemisches Taschenbuch*, Springer Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1956, 649—655.
3. Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., Inwood, M. J. H., *Medical Laboratory Technology and Chimical Pathology*, Ed. W. B. Saunders Company, 1969.

REDACTOR: MIRCEA ȘTEFAN
TEHNOREDACTOR: L. HLAVATHY

APĂRUT: 1976. BUN DE TIPAR: 5. II. 1976. COMANDA NR. 1275. COLI DE TIPAR: 32,25. HÎRTIA: SCRIS I A 70 G/M². FORMAT: 16/61×86. TIRAJ: 4900+90 LEGATE. C.Z. PENTRU BIBLIOTECI: 616—074/—078.

TIPARUL EXECUTAT SUB COMANDA NR. 653/1976. LA ÎNTREPRINDEREA POLIGRAFICĂ CLUJ — MUNICIPIUL CLUJ-NAPOCA STR. BRASSAI NR. 5—7. REPUBLICA SOCIALISTĂ ROMÂNIA

Scanned with OKEN Scanner